

IMMOBILISIERUNG VON MIKROORGANISMEN DURCH
EINSCHLUSS IN SYNTHETISCHE VERNETZTE GELE UND
COVALENTE BINDUNG AN REAKTIVE POLYMERE TRÄGER

— BIOKATALYSATOREN FÜR DIE STERIOD-TRANSFORMATION —

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Udo Klussmann
aus Tittingdorf

1984

IMMOBILISIERUNG VON MIKROORGANISMEN DURCH EINSCHLUSS IN
SYNTHETISCHE VERNETZTE GELE UND COVALENTE BINDUNG AN RE-
AKTIVE POLYMERE TRÄGER
- BIOKATALYSATOREN FÜR DIE STEROID-TRANSFORMATION -

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Udo Klussmann
aus Tittingdorf

1984

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Manecke

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Koßmehl

Tag der mündlichen Prüfung: 1. 8. 1984

Tag der Promotion:

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Manecke am Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. G. Manecke, danke ich für das Thema dieser Arbeit, für die vielen wertvollen Anregungen und ausführlichen Diskussionen sowie für die mir in jeder Hinsicht großzügig gewährte Unterstützung.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. W. Beier für die anregenden Diskussionen im Verlauf dieser Arbeit.

Außerdem danke ich Herrn Dr. W. Lamer für die Anfertigung der HPLC-Analysen, Herrn A. Melzer für die Hilfe bei der Interpretation der IR-Spektren und Herrn R. Zander für die Mithilfe bei der präparativen Arbeit an Synthesepulp.

Für die Überlassung des in dieser Arbeit verwendeten Corynebacterium simplex- und Bacillus sphaericus-Trockenpulvers sowie für das Hydrocortison und Prednisolon danke ich der Schering AG Berlin.

Ganz besonders danke ich meiner Frau Christiane für ihre Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1.	Einleitung 5
1.1.	Mikrobiologische Verfahren 5
1.2.	Immobilisierte Enzyme 5
1.3.	Immobilisierte Mikroorganismen 7
1.4.	Vergleich der Anwendung von Biokatalysatoren mit chemischen Reaktionen 8
1.5.	Vor- und Nachteile der Immobilisierung von Mikroorganismen 9
1.6.	Methoden zur Immobilisierung von Mikroorga- nismen 10
1.7.	Steroid-Umwandlung mit immobilisierten Mikro- organismen 11
2.	Aufgabenstellung 14
3.	Spezieller Teil 15
3.1.	Immobilisierung von Corynebacter. simplex und Bacillus sphaericus in vernetzte Gele 15
3.1.1.	Einschluß von Corynebacter. simplex und Ba- cillus sphaericus Zellen in vernetzte Poly- ethylenimin-Gele 15
3.1.1.1.	Vernetzung mit Glutaraldehyd 16
3.1.1.2.	Vernetzung mit Polyacrolein 19
3.1.1.3.	Optimierung der Immobilisierungsreaktion durch Variation der Vernetzermenge 22
3.1.2.	Einschluß von Corynebacter. simplex und Ba- cillus sphaericus Zellen in Acrolein-N-vinyl- pyrrolidon-Copolymere 24
3.1.2.1.	Herstellung und Eigenschaften des Copolymeren 24
3.1.2.2.	Vernetzungsversuche an Acrolein-NVP-Copolyme- ren 29
3.1.2.3.	Darstellung der Vernetzer 33
3.1.2.4.	Eigenschaften der Dioxydiamine, die ihre Eig- nung als Vernetzer beeinflussen 38
3.1.2.5.	Immobilisierungsversuche 40
3.1.3.	Aktivitätsbestimmung 41
3.1.3.1.	Steroid-Bestimmung mittels Spektralphotome- trie 44

	Seite
3.1.3.2.	Steroid-Bestimmung mittels Differential-Puls-Polarographie 46
3.1.4.	Eigenschaften der immobilisierten Zellen 51
3.1.4.1.	Verhältnis von Naßgewicht zu Trockengewicht der eingesetzten Immobilisate 53
3.1.4.2.	Abhängigkeit der Aktivität der Immobilisate von der Zellbeladung 54
3.1.4.3.	Abhängigkeit der Aktivität der Immobilisate von der Temperatur und dem pH-Wert bei der Steroid-Umwandlung 56
3.1.4.4.	Abhängigkeit der Aktivität der Immobilisate von der Cofaktor-Konzentration 59
3.1.4.5.	Steigerung der Aktivität durch Enzyminduktion und Zellwachstum 62
3.1.4.6.	Weitere Versuche zum Nachweis des Zellwachstums eingeschlossener C. simplex Zellen 70
3.1.4.7.	Einfluß der Zellbeladung während der Einschließung von C. simplex auf die Aktivität der Immobilisate unter Berücksichtigung von Enzyminduktion und Zellwachstum 73
3.1.4.8.	Abhängigkeit der Aktivität der Immobilisate von der Substratkonzentration 75
3.1.4.9.	Steroid-Umwandlungen an festem Hydrocortison . 81
3.1.4.10.	Aktivitäten eingeschlossener B. sphaericus Zellen 88
3.1.4.11.	Langzeit-Stabilitäten der eingeschlossenen C. simplex und B. sphaericus Zellen 92
3.1.4.11.1.	Stabilität unter Betriebsbedingungen 92
3.1.4.11.2.	Lagerstabilität 97
3.1.4.12.	Abhängigkeit der Aktivität von der Korngröße der Immobilisate 98
3.2.	Versuche zur covalenten Bindung von C. simplex an Synthesepulp SWP 99
3.3.	Mikroskopische Aufnahmen der Immobilisate 103
4.	Experimenteller Teil 107
5.	Zusammenfassung 134
6.	Literaturverzeichnis 145

1. EINLEITUNG

1.1. Mikrobiologische Verfahren

Mikrobiologische Prozesse werden von der Menschheit schon seit Jahrhunderten angewandt; denken wir nur an die Herstellung von Brot, Bier, Wein und Käse.

In neuerer Zeit werden Mikroorganismen zunehmend dazu benutzt, auch andere chemische Reaktionen zu katalysieren. In teilweise groß angelegten Fermentationsprozessen werden z. B. Äthanol, Butanol, Aceton, einfache organische Säuren und Aminosäuren produziert. Auch wertvolle Arzneistoffe wie Antibiotika, Alkaloide, Steroide und Vitamine lassen sich mit Hilfe von Mikroorganismen herstellen. Weiterhin werden in zunehmendem Maße herkömmliche chemische Syntheseverfahren durch Biotransformationen wie Oxidationen, Reduktionen, Decarboxylierungen, Phosphorylierungen, Aminierungen, Desaminierungen, Abspaltung oder Addition von Seitenketten sowie Acetylierungen und Desacetylierungen ersetzt (1). Dabei macht man sich die Tatsache zunutze, daß mikrobiologische Verfahren äußerst gezielt auf bestimmte Produkte anwendbar sind, auch mehrstufige, komplizierte Prozesse in hohen Ausbeuten ablaufen und eventuelle Umweltbelastungen durch Nebenprodukte, Lösungsmittel usw. gering gehalten werden können.

1.2. Immobilisierte Enzyme

Träger der katalytischen Wirkung von Mikroorganismen sind die Enzyme. Es besteht die Möglichkeit, die Enzyme aus den Zellen zu isolieren und sie direkt als Biokatalysatoren einzusetzen. Praktisch läßt sich dies jedoch oft schwierig durchführen, da manche, insbesondere membrangebundene Enzyme bei der Isolierung desaktiviert werden oder zur Durchführung der Reaktion z. B. einen Cofaktor wie NADPH_2 benötigen. Selbst wenn es gelingt, stabile Enzympräparate herzustellen, macht doch die Abtrennung des Enzyms vom Reaktionsmedium Schwierigkeiten.



Sie können daher nur einmal verwendet werden. Da solche Verfahren ausgesprochen teuer sind, wurden innerhalb der letzten Jahrzehnte zahlreiche Methoden entwickelt, die Enzyme an leicht abtrennbare Feststoffpartikel zu fixieren. Aus der zahlreichen Literatur auf diesem Gebiet sei auf die Übersichtsartikel von Zaborsky (2) sowie von Goldstein und Manecke (3) hingewiesen. Immobilisierte Enzyme besitzen im allgemeinen eine höhere Langzeitstabilität und sind thermisch belastbarer als freie Enzyme. Die immobilisierten Enzyme können in kontinuierlich arbeitenden Prozessen sowie in Säulen- und Batch-Reaktoren eingesetzt werden.

Im Folgenden sei auf einige technologische Verfahren hingewiesen, bei denen in großem Maßstab immobilisierte Enzyme angewendet werden. Dazu gehört in erster Linie der Einsatz von Amylasen und Glucose-Isomerasen in der Zuckerindustrie. Die seit den 70-er Jahren gestiegenen Rohrzuckerpreise führten in den USA zu Bemühungen, eine Alternative zur Sucrose zu finden. Es wurde ein Verfahren entwickelt, das unter Verwendung von immobilisierter Glucoamylase billige Maisstärke in Glucose umwandelt (4). Da Glucose allein noch keine ausreichende Süßkraft hat, wird etwa die Hälfte davon durch immobilisierte Glucose-Isomerase in Fructose umgewandelt (5,6,7). Dieser sogenannte "High fructose syrup" (HFS) ist dem Invertzucker vergleichbar und dient zur Herstellung von Backwaren, Süßwaren, Limonaden usw. 1976 sind z. B. in den USA schätzungsweise 1,6 Millionen Tonnen HFS produziert worden (8).

Es sind jedoch auch Verfahren entwickelt worden, die anstelle der immobilisierten Glucose-Isomerase ganze, in Collagen eingeschlossene Zellen (*Streptomyces venezuelae*) als Biokatalysator verwenden (9).

Die zeitlich erste Anwendung von immobilisierten Enzymen in der Technik wurde 1962 in Japan von der Tanabe Seiyaku Co. durchgeführt, welche immobilisierte Aminoacylase bei der Produktion von L-Aminosäuren verwenden. In einem kontinuierlichen, automatisch gesteuerten Prozeß wird eine Mischung aus L- und D-Aminosäuren acyliert und danach mit der immobilisierten Aminoacylase behandelt. Man erhält die gewünschte L-Aminosäure und unveränderte N-Acyl-D-Aminosäure, die aufgrund von Löslich-

keits-Unterschieden voneinander getrennt werden können. Die acylierte D-Form wird racemisiert und wiederverwendet (10,11). Ein weiteres Anwendungsgebiet für trägergebundene Enzyme ist die Produktion von halbsynthetischen Penicillinen: Die wichtige Zwischenstufe 6-Aminopenicillansäure (6-APA) wird mit Hilfe von immobilisierter Penicillin-Acylase aus Benzylpenicillin hergestellt. Dieses Verfahren, das sich durch besondere Reinheit der Produkte auszeichnet, hat besonders in Schweden, Italien und den USA an Bedeutung gewonnen (12,13).

1.3. Immobilisierte Mikroorganismen

Wie bereits am Beispiel der Glucose-Isomerase geschildert, ist es in vielen Fällen möglich, statt der immobilisierten Enzyme Mikroorganismen einzusetzen, die dieses Enzym besitzen oder synthetisieren. Werden ganze Zellen immobilisiert und zur Umwandlung verschiedener Substrate eingesetzt, bedeutet dies die Einführung einer zusätzlichen Diffusionsbarriere in Form der Zellmembran. Dadurch wird die Reaktivität vermindert, und es können nur niedermolekulare Substrate umgewandelt werden. Dem stehen jedoch eine ganze Reihe von Vorteilen gegenüber. So werden zunächst die oft hohen Kosten der Enzym-Reindarstellung vermieden. Weiterhin ist zu beachten, daß viele Enzyme außerhalb ihrer natürlichen Umgebung instabil sind, so z. B. auch die 3-Ketostereoid- Δ^1 -dehydrogenase aus *Bacillus sphaericus*, die als Zell-freie Präparation nur wenige Stunden aktiv bleibt (14).

Während immobilisierte Enzyme im allgemeinen nur einen einzigen Reaktionsschritt katalysieren, können immobilisierte Mikroorganismen eingesetzt werden wie ein Multienzymsystem (15) oder auch zu Reaktionsfolgen, die intracelluläre Metabolite wie z. B. Coenzyme erfordern (16). Das Interesse an der Verwendung von immobilisierten Zellen wurde enorm gesteigert, nachdem man erkannt hatte, daß sich die eingeschlossenen Mikroorganismen durch ein Nährmedium reaktivieren ließen (17). Es soll jedoch nicht verschwiegen werden, daß immobilisierte Zellen im allgemeinen zu weniger reinen Produkten führen, da Nebenreaktionen stattfinden können und der Zellstoffwechsel einen Teil des

Substrats verbraucht. Eine Verbesserung der Ausbeute läßt sich oft durch eine Optimierung der Reaktionsbedingungen erreichen (18) oder durch eine selektive Inaktivierung des die Nebenreaktion hervorrufenden Enzyms (19).

1.4. Vergleich der Anwendung von Biokatalysatoren mit chemischen Reaktionen

Wie bereits eingangs erwähnt, lassen sich biochemische Verfahren substratspezifisch und besonders gezielt auf gewünschte Produkte z. B. optisch aktive Verbindungen anwenden, während herkömmliche chemische Prozesse nur in seltenen Fällen derartig selektiv wirken. Weitere Vorteile der Verwendung von Biokatalysatoren sind die milden Reaktionsbedingungen, damit verbunden ein geringerer Energieverbrauch. Die Vermeidung von aggressiven Reagentien und Abfällen führt zu einer geringeren Umweltbelastung. Da in vielen Fällen als Substrate nachwachsende Ressourcen oder Abfälle an organischen Produkten verwendet werden können, unterstützt der Einsatz von immobilisierten Biomaterialien das Bestreben, Rohstoffe zu schonen und aus Abfällen hochwertige Güter wie Treibstoffe, Kohlenwasserstoffe zur Herstellung von Kunststoffen, Futtermittel und Arzneimittel zu erzeugen (20).

Die Nachteile der Biokatalysatoren sind ihre Empfindlichkeit gegenüber extremen Reaktionsbedingungen wie Temperatur und pH-Wert. Man muß sich meist auf wasserlösliche Substrate beschränken, denn infolge der Empfindlichkeit der Biokatalysatoren können nur in Ausnahmefällen organische Lösungsmittel eingesetzt werden wie z. B. bei der Synthese von N-acetyl-L-tryptophan-ethylester in 100 % Ausbeute aus dem Alkohol und der Säure mit immobilisiertem Chymotrypsin in Chloroform (21) oder bei der Δ^1 -Dehydrogenierung von 4-Androsten-3,17-dion mit *Nocardia rhodocrous* in Benzol/n-Heptan (22) um einige interessante Beispiele zu nennen.

1.5. Vor- und Nachteile der Immobilisierung von Mikroorganismen (23)

Ähnlich wie bei den Enzymen führt auch bei Mikroorganismen eine Trägerfixierung zu einer Veränderung der Eigenschaften, die manche Prozesse erst ermöglichen. Der größte Vorteil ist die Möglichkeit der Wiederverwendung der immobilisierten Mikroorganismen. Während frei suspendierte Zellen nur in Batch-Prozessen eingesetzt werden können und nach Beendigung der Umwandlung beseitigt werden, lassen sich mit den trägerfixierten Biokatalysatoren kontinuierliche Verfahrensweisen durchführen. Dabei können hohe Zellbeladungen aufrechterhalten werden, was zu hohen Umwandlungsraten führt.

Sind die Mikroorganismen an relativ großen Partikeln fixiert, führt dies zu einer niedrigeren Viskosität, als wenn die gleiche Anzahl Zellen frei suspendiert wäre. Dadurch ergeben sich eine bessere Durchmischung und wegen des gesteigerten Stofftransportes höhere Umwandlungsraten. Ist für die gewünschte enzymatische Aktivität ein Wachstum der Zellen nicht erforderlich, wie z. B. bei den Steroid-Umwandlungen mit *C. simplex* (24), kann auf die Zugabe von Nährstoffen verzichtet werden, während auf der anderen Seite bei der Durchführung des herkömmlichen Fermentationsprozesses zur anfänglichen Anzüchtung der erforderlichen Zellmenge in jedem Fall Nährstoffe benötigt werden. Findet in der polymeren Matrix eine Anreicherung des Substrates statt, wie es oft bei schwer wasserlöslichen Substanzen wie Steroiden der Fall ist, so führt dies infolge des verbesserten Stofftransportes zu einer Aktivitätssteigerung.

Nachteile bei den immobilisierten Mikroorganismen ergeben sich dadurch, daß in einer Zelle normalerweise viele aktive Enzyme vorhanden sind und durch den Immobilisierungsprozeß gerade die gewünschten Enzyme inhibiert sind. Auch kann die polymere Gelmatrix eine Diffusionsbarriere für das Substrat bedeuten, und häufig sind nur die sich an den äußeren Stellen einer Gelpartikel befindlichen Zellen katalytisch aktiv.

Welche der bisher geschilderten Vor- und Nachteile bei dem angewendeten System auftreten ist natürlich abhängig von der zu

katalysierenden Reaktion und von den Eigenschaften des polymeren Trägers. Wie bei den immobilisierten Enzymen wird es auch bei der Immobilisierung von ganzen Zellen keine universelle Matrix geben. Optimale Eigenschaften können auch hier nur durch ein "maßgeschneidertes" Trägersystem realisiert werden.

1.6. Methoden zur Immobilisierung von Mikroorganismen

Unter Mikroorganismen versteht man Einzeller und unterscheidet in Eukarionten (Algen, Pilze und Hefen) und Prokarioten (Bakterien und Blaualgen). Letztere haben keinen Zellkern (25).

Die Immobilisierung von Mikroorganismen kann prinzipiell nach den gleichen Methoden durchgeführt werden wie sie für die Trägerfixierung von Enzymen bekannt sind. Da die Anzahl der Veröffentlichungen in den letzten Jahren sprunghaft zugenommen hat, sei auf Übersichtsartikel verwiesen (26, 27, 28) und seien hier nur die wichtigsten Verfahren erwähnt.

Eines der ersten Beispiele für eine Zell-Immobilisierung war die Einschließung von Corynebact.-Simplex Zellen in Polyacrylamid-Gele durch Mosbach und Larsson 1970 (17). Dieses Verfahren ist schnell und einfach durchzuführen und wurde bereits für eine Vielzahl von Zellen angewandt. Zwei wichtige, in Japan durchgeführte industrielle Prozesse mit Polyacrylamid-gel fixierten Mikroorganismen sind die Herstellung von L-Asparaginsäure aus Ammoniumumarat mit *Escherichia coli* Zellen und die Produktion von L-Äpfelsäure aus Fumarsäure mit *Brevibacterium ammoniagenes* (29).

Ein weiteres Verfahren der Zell-Immobilisierung ist die Einschließung in ein ionisches Netzwerk. Ein Beispiel dafür ist die Vernetzung von Alginat-Lösungen mit Calciumionen in Gegenwart von *Candida tropicalis* (30).

Diese Methode der ionotropen Gelbildung ist zwar sehr schonend und führt zu mechanisch stabilen Produkten, hat aber den Nachteil, daß Chelatbildner wie EDTA oder Kaliumionen zu einer Auflösung der Immobilisate führen. Eine Verbesserung des Ver-

fahrens wurde erzielt, indem die Alginat-Perlen in Anwesenheit eines Epoxidharzes hergestellt wurden (31).

Eine weitere Möglichkeit ist der Einschluß von Mikroorganismen in andere natürliche Polymere wie Collagen oder Carra-geenan durch nachträgliche Vernetzung mit Glutaraldehyd (32, 33) oder Agar durch Wechsel der Temperatur (34).

Weitere Methoden wie die Mikroenkapselung (35), kovalente Bindung (36, 37, 38) oder Zell-Adsorption (39) haben keine große Bedeutung erlangt.

1.7. Steroid-Umwandlung mit immobilisierten Mikroorganismen

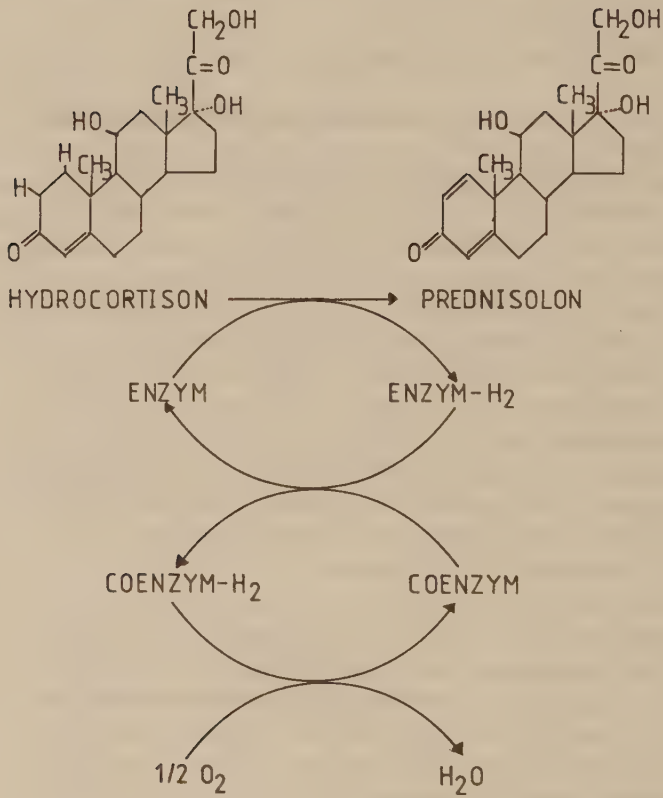
1952 wurde Hydrocortison (44-Pregnen-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-dion) als Therapeutikum gegen Allergien und andere Hautkrankheiten eingeführt. Es stellte sich jedoch heraus, daß bei längerem Gebrauch dieses Mittels bei manchen Patienten als Nebenwirkung ein hoher Salzurückhalte-Effekt auftrat, der die gewünschte entzündungshemmende Wirkung teilweise aufhob.

Glücklicherweise wurde 1955 entdeckt, daß Hydrocortison durch das Bakterium *Corynebacter. simplex* zu Prednisolon (41,4-Pregnadien-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-dion) dehydriert werden kann und das letzteres drei- bis fünffach aktiver als das natürliche Corticosteroid und frei von den genannten Nebenwirkungen ist (40). Seitdem besteht ein gesteigertes Interesse daran, die Steroid-Transformation des Hydrocortison zu Prednisolon zu optimieren.

Die Dehydrogenierungsreaktion erfordert ein Enzym, die 3-Ketosteroid- Δ 1-dehydrogenase und ein Coenzym, das als Elektronenüberträger dient. Der vermutliche Reaktionsmechanismus wird durch eine enzymatische Enolisierung der 3-Keto-Gruppe gegen die 2-Position eingeleitet (14), gefolgt von einer Übertragung des Wasserstoffs in der 1-Position auf den Cofactor mit anschließendem Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes (Abbildung 1). Als Ergebnis ist eine neue Doppelbindung zwischen der 1- und 2-Position des Steroids eingeführt worden. Die Regenerierung des Coenzyms erfolgt durch Luftsauerstoff, wodurch sich der Kreis wieder schließt.

Abbildung 1

Reaktionsschema der mikrobiellen Steroid-Umwandlung



Als Mikroorganismen mit 3-Ketosteroid-41-dehydrogenase-Aktivität werden neben den bereits erwähnten *C. simplex* auch *Bacillus sphaericus* (41), *Arthrobacter globiformis* 193 (42) und *Nocardia rhodocrous* (43) verwendet. Industriell werden Steroid-Transformationen fast ausschließlich in Fermentern mit frei suspendierten Zellen durchgeführt, während Verfahren, die mit immobilisierten Zellen arbeiten, bisher nur im Labormaßstab oder höchstens halbtechnisch verwirklicht worden sind.

Die ersten, die über den erfolgreichen Einsatz von in Polyacrylamid eingeschlossenen *Corynebacter. simplex* Zellen zur Steroidumwandlung berichteten, waren - wie bereits erwähnt - Mosbach und Larsson (17). Es folgten von derselben Arbeitsgruppe mehrere Veröffentlichungen, in denen über die Vermehrungsfähigkeit und die Aktivierung der immobilisierten *C. simplex* referiert wurde (44, 45, 46, 47), wobei außer Polyacrylamid auch Calcium-Alginat als einschließendes Medium zur Anwendung kam (48, 49).

In Japan wurden Aceton-getrocknete *Corynebacter. simplex* Zellen in hydrophile Urethan-Prepolymere (50) oder photovernetzte Polymere (51, 52) eingeschlossen und zur Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon eingesetzt.

In den USA immobilisierten Venkatasubramanian (53) und Constantinides *Corynebacter. simplex* in Collagen-Membranen, wobei Umsetzungen an Hydrocortison bei hohen Substratkonzentrationen durchgeführt werden konnten (54).

In der UdSSR wurden *Arthrobacter. globiformis* 193 Zellen in verschiedenen Membranen (42) und Polyacrylamid (55) eingeschlossen, um nur zwei Beispiele aus einer großen Anzahl von Veröffentlichungen dieser Arbeitsgruppe zu nennen.

In unserer Arbeitsgruppe wurden kürzlich *Corynebacter. simplex* Zellen eingeschlossen in thiolierten Polyvinylalkohol durch oxidative Vernetzung mit Luftsauerstoff (56) sowie in vinylierten Polyvinylalkohol durch lichtinduzierte vernetzen-
de Polymerisation (57).

2. AUFGABENSTELLUNG

Es war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, Polymere zu finden, die in der Lage sein sollten, durch eine Vernetzung Mikroorganismen einzuschließen. Am Beispiel von *Corynebacter. simplex* sollte die Möglichkeit untersucht werden, einen Biokatalysator herzustellen, der mechanisch, stabil, biologisch aktiv und wiederverwendbar sein sollte.

Dieser Biokatalysator sollte zur Steroid-Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon eingesetzt werden, wobei im Vergleich mit herkömmlichen Verfahren eine Erhöhung der Ausbeute und eine Verbesserung der Wirtschaftlichkeit angestrebt wurde. Es war die Abhängigkeit der Aktivität des Biokatalysators von den Immobilisierungsbedingungen, der Zellbeladung und den Reaktionsbedingungen wie Temperatur, pH-Wert und Substratkonzentration zu untersuchen.

Besondere Bedeutung wurde auf die Möglichkeit gelegt, die eingeschlossenen Zellen durch Behandlung mit einer Nährlösung zu reaktivieren, eine hohe Lagerstabilität und eine hohe Stabilität unter Betriebsbedingungen zu erzielen.

Als einschließendes Medium sollte zuerst Polyethylenimin untersucht werden, da dieses Polymere bereits in der Diplomarbeit als Träger zur Immobilisierung von Enzymen verwendet worden war, und entsprechende Erfahrungen damit bestanden. Weiterhin sollten aber auch andere, zur Einschließung von ganzen Zellen geeignete Polymere gefunden werden.

Schließlich bestand noch der Wunsch, andere Möglichkeiten als den Polymereinschluß zur Zellfixierung zu realisieren, wie z. B. die covalente Bindung von ganzen Zellen an eine polymere Matrix.

3. SPEZIELLER TEIL

3.1. Immobilisierung von Corynebacterium simplex und Bacillus sphaericus in vernetzte Gele

Es werden im folgenden Kapitel die Möglichkeiten der Einschließung von Mikroorganismen in zwei verschiedene Polymere - Polyethylenimin und Poly(acrolein-co-N-vinylpyrrolidon) - dargestellt.

Aus Gründen der besseren Überschaubarkeit soll im ersten Abschnitt nur die Herstellung sämtlicher Polymer-Zell-Konjugate beschrieben werden, wobei auch Optimierungen bezüglich der Vernetzerkonzentration und der Reaktionsbedingungen berücksichtigt werden.

Im zweiten Abschnitt werden dann die katalytischen Eigenschaften der Immobilisate beschrieben und miteinander verglichen.

3.1.1. Einschuß von Corynebacter. simplex und Bacillus sphaericus Zellen in vernetzte Polyethylenimin-Gele

Polyethylenimin (PEI) wurde deshalb als Ausgangspolymeres zur Immobilisierung von Corynebacter. simplex (C. simplex) und Bacillus sphaericus Zellen gewählt, weil es gut wasserlöslich ist und mit bi- oder multifunktionellen Aldehyden gut vernetzt werden kann.

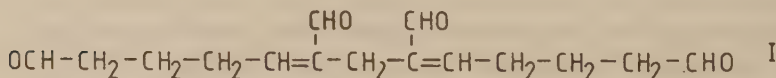
Es wurde käufliches PEI mit einem Molekulargewicht von 30.000 bis 40.000 Dalton als 50 %ige Lösung in Wasser verwendet. Um es für Mikroorganismen verträglich zu machen, wurde es mit halbkonzentrierter Salzsäure neutralisiert und drei Tage gegen Wasser dialysiert. Die gereinigte Lösung wurde bis auf einen Gehalt von 10 % (w/w, bezogen auf PEI als freier Base) verdünnt und so zu Immobilisierungsversuchen eingesetzt.

3.1.1.1. Vernetzung mit Glutaraldehyd (GA)

Glutaraldehyd ist als Fixierungsmittel in der Elektronenmikroskopie bekannt. Als bifunktionales Reagenz wurde es auch zur Vernetzung von Proteinen untereinander (58), zur Anbindung von Enzymen an eine feste Matrix (59) und zur nachträglichen Härtung von Carrageenan-Zell-Immobilisaten (33) benutzt.

Es erschien daher aussichtsreich, Glutaraldehyd als Vernetzer von PEI einzusetzen, um damit *C. simplex* und *Bacillus sphaericus* einzuschließen, da die Aminogruppen des Polymeren - ähnlich den Proteinen - gut mit dem Bis-aldehyd reagieren sollten.

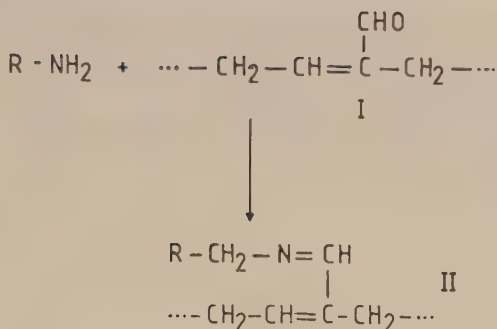
Die chemische Natur der Reaktion von Glutaraldehyd mit Proteinen ist vielfach untersucht worden, ohne jedoch vollständig geklärt zu sein (60). Man nimmt an, daß Glutaraldehyd bei längerem Stehen und handelsüblicher Glutaraldehyd im besonderen durch Aldolkondensation zu ungesättigten oligomeren Aldehyden I reagieren (61), wie es im Folgenden für drei Moleküle Glutaraldehyd angedeutet ist:



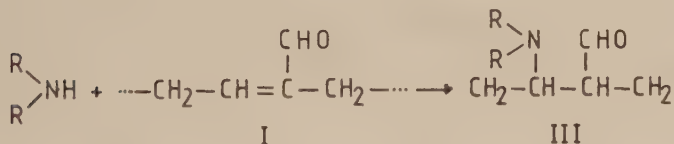
Durch die zu den Aldehydgruppen α, β -ständigen Doppelbindungen erklärt sich auch die gelbe Farbe von handelsüblichen Glutaraldehydlösungen.

Es sind zwei Möglichkeiten vorgeschlagen worden, wie die α, β -ungesättigten Aldehyde mit Aminogruppen von Proteinen reagieren können:

1.) Es kommt zur Ausbildung einer Schiffischen Base II, wobei die Azomethin-Struktur durch die konjugierte Doppelbindung des ungesättigten Aldehyds resonanzstabilisiert ist (62).



2.) Eine primäre oder auch sekundäre Aminogruppe wird nach Art einer Michael-Addition an die Doppelbindung des ungesättigten Aldehyds addiert (61) III.



Beide Reaktionen sollten auch gemeinsam an ein und derselben Glutaraldehyd-Grundstruktur stattfinden können, wie aus der Literatur über die Reaktionen vinyloger Carbonylverbindungen bekannt ist (63).

Es besteht Grund zu der Annahme, daß die beschriebenen Reaktionsmöglichkeiten auch bei der Vernetzung des PEI mit Glutaraldehyd stattfinden.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete PEI ist stark verzweigt und besitzt sowohl sekundäre als auch primäre und tertiäre Aminogruppen im Verhältnis 1 : 2 : 1 (64).

Bei der Vernetzung mit Glutaraldehyd wird angenommen, daß

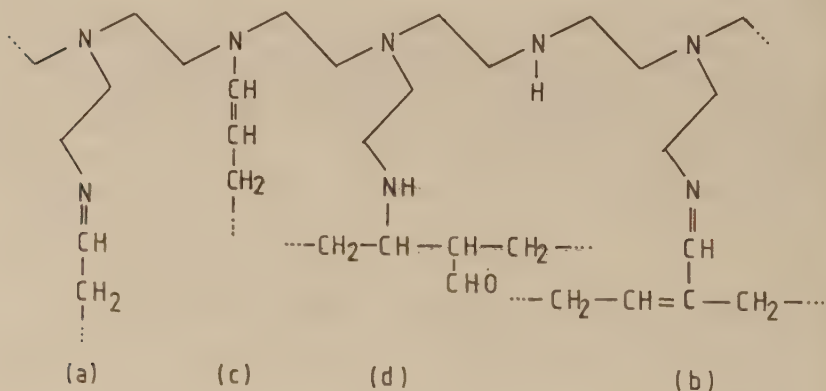
eine Reaktion unter Ausbildung der oben genannten Strukturen stattfindet.

In Abbildung 2 sind die Reaktionsmöglichkeiten von PEI mit Glutaraldehyd schematisch dargestellt, wobei wahrscheinlich folgende Einzelreaktionen auftreten können:

- Schiffsche Basen-Bildung mit monomeren Glutaraldehyd
- Schiffsche Basen-Bildung mit oligomeren Glutaraldehyd
- Bildung von Enaminen
- Michael-Addition

Abbildung 2

Vernetzung von PEI mit Glutaraldehyd



wobei die Aldehydgruppe des Strukturelements (d) wahrscheinlich mit weiteren Aminogruppen des PEI reagieren wird.

Es wurde nicht untersucht, welche Reaktion in der Hauptsache abläuft.

Das Auftreten einer intensiven Braunfärbung während der Vernetzungsreaktion von PEI mit Glutaraldehyd deutet jedoch auf die Bildung von resonanzstabilisierten Schiffschen Basen (b) hin.

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß eine geringere Menge

Glutaraldehyd zur Vernetzung des PEI notwendig ist, als dem stöchiometrischen Verhältnis zwischen den Aldehydgruppen und den PEI-Wiederholungseinheiten entspricht.

Die Immobilisierung der Mikroorganismen erfolgte, indem zuerst das Bakterientrockenpulver mit der gereinigten PEI-Lösung glattgerührt wurde. Glutaraldehyd wurde als 25 %ige wässrige Lösung unter starkem Rühren zugegeben, worauf sich das Reaktionsgemisch innerhalb von Sekunden zu einem Gel verfestigte. Es war zunächst schwach gelb gefärbt, die Farbe vertiefte sich jedoch immer mehr zu braun.

Das Polymer-Zell-Konjugat wurde grob zerkleinert und in Phosphat-Puffer (pH = 6,85) gewaschen. Ließen sich Zellen auswaschen, wurde deren Konzentration photometrisch bestimmt, indem die Extinktion des überstehenden Teils der Waschlösung bei 546 nm bestimmt und mit Eichlösungen bekannten Gehaltes verglichen wurde. Aus der Differenz der Einwaage an Zellen und der gefundenen Menge an ausgewaschenen Zellen wurde die Zellkonzentration im Immobilisat berechnet.

Die Gelpartikel wurden anschließend naß gesiebt und die Siebfractionen von 0,1 - 0,2 und 0,2 - 0,5 mm Durchmesser durch Absaugen auf einer Glasfritte von anhängender Flüssigkeit befreit und im feuchten Zustand gekühlt aufbewahrt. Ein Teil der einzelnen Siebfractionen wurde zur Bestimmung des Verhältnisses zwischen Naß- und Trockengewicht lyophilisiert.

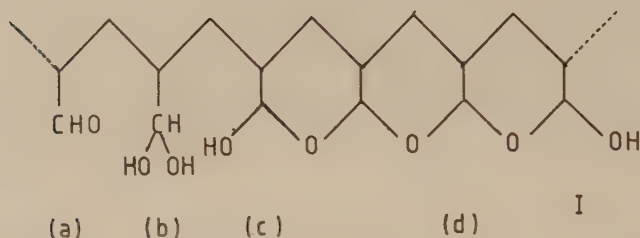
3.1.1.2. Vernetzung mit Polyacrolein (PA)

Als weiterer Vernetzer wurde Polyacrolein verwendet.

Die Herstellung und die Eigenschaften des Polyacroleins sind insbesondere dank der grundlegenden Arbeiten von R. C. Schulz (65, 66, 67, 68) bekanntgeworden.

Das Polymere läßt sich durch Redox-Polymerisation aus Acrolein gewinnen. Dabei kann der Radikal-Ketten-Mechanismus durch das Redox-System Kaliumperoxydisulfat/Silbernitrat angeregt werden (65).

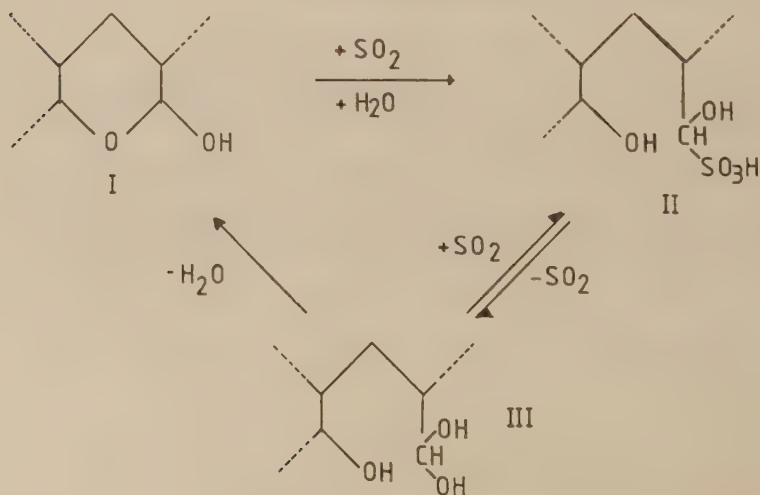
Polyacrolein besitzt wahrscheinlich die folgende Struktur (I):



Die Aldehydgruppen liegen nur zum Teil in freier Form vor (a), hauptsächlich als Aldehydhydratgruppen (b), von denen wiederum ein wesentlicher Teil Aldehydhydrat-Äther-Gruppierungen bildet, so daß halbacetalartige (c) und acetalartige (d) Strukturen entstehen, die auch zur Vernetzung der Kettenmoleküle führen können.

Das Polymere ist in Wasser und allen organischen Lösungsmitteln unlöslich, es läßt sich jedoch durch die Addition von schwefliger Säure oder Natriumbisulfit in eine wasserlösliche Form überführen (65).

Die Bisulfit-Additionsverbindung (II) steht mit einer ebenfalls wasserlöslichen, hydratisierten Form (III) des Polyaldehyds im Gleichgewicht (68).

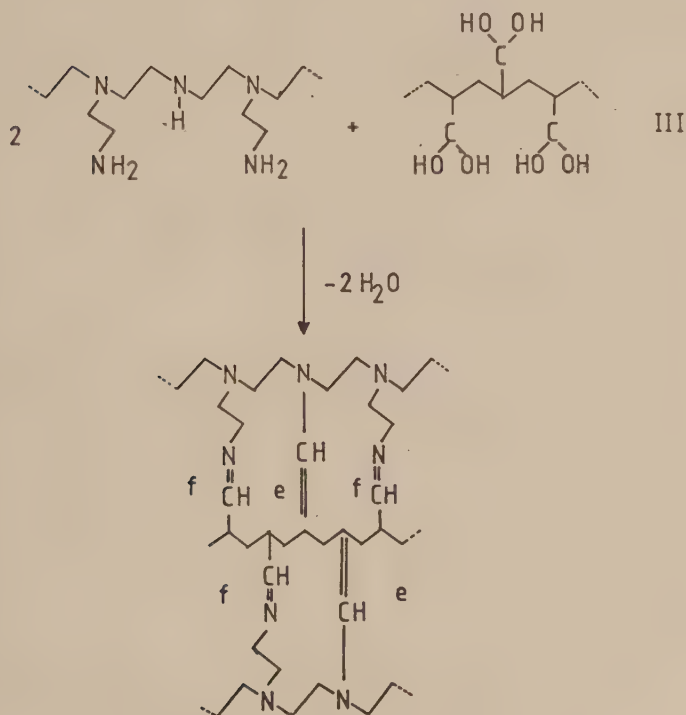


Das auf diese Weise wasserlöslich gemachte Acrolein reagiert wie ein hypothetischer, wasserlöslicher Polyvinyl-Aldehyd und ist in der Lage, mit reaktiven Gruppen anderer Polymere zu reagieren (67), wobei durch Hauptvalenzbindungen vernetzte "Verbundpolymere" entstehen (68).

Auch PEI läßt sich durch lösliches Polyacrolein vernetzen, wobei die Bindung wie im Falle des Glutaraldehyds über Enamine e oder Schiff'sche Basen f erfolgte.

Abbildung 3

Vernetzung von PEI mit Polyacrolein



Um Polyacrolein als Vernetzer für die Immobilisierung von Mikroorganismen geeignet zu machen, wurde es zunächst durch Behandeln mit einer Na-bisulfit-Lösung in eine wasserlösliche Form gebracht und danach drei Tage gegen Wasser dialysiert, um den Gehalt an Hydrogensulfitionen und SO_2 soweit wie möglich herabzusetzen. Das Polymere wurde als 22 Gew.%ige Lösung eingesetzt, der Aldehydgruppengehalt wurde durch Oximtitration (69) bestimmt. Er betrug 7,7 mMol pro g Polymeres.

Die Immobilisierung wurde durchgeführt wie schon bei der Vernetzung mit Glutaraldehyd beschrieben. Jedoch verlief hier die Vernetzungsreaktion etwas langsamer. Es bildeten sich hellbraun gefärbte Klumpen von ausgefallenem Polymer-Zell-Konjugat, die sich innerhalb von Minuten verfestigten. Sie wurden ebenfalls mit Phosphatpuffer gewaschen, wobei auch hier der Anteil an nicht immobilisierten Zellen durch Bestimmung der optischen Dichte der Waschlösung ermittelt wurde. Siebung und Aufbewahrung der Immobilisate erfolgte wie bei den mit Glutaraldehyd vernetzten Produkten.

3.1.1.3. Optimierung der Immobilisierungsreaktion durch Variation der Vernetzermenge

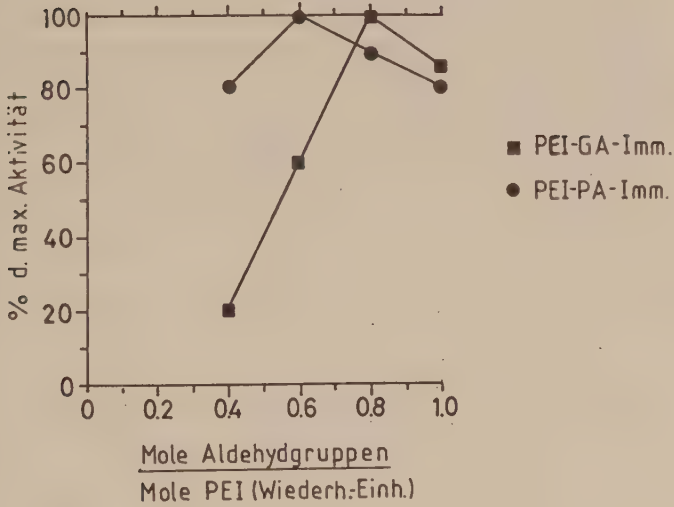
Wie schon erwähnt, besitzt PEI aufgrund seiner Verzweigung einen gewissen Anteil an tertiären Stickstoffatomen, die für eine Vernetzung nicht zur Verfügung stehen. Daher war zu erwarten, daß für eine optimale Vernetzung weniger als ein Mol Aldehydgruppen des Vernetzers pro Monomereinheit Ethylenimin ausreichen müßten, und im Falle des vollständigen Abreagierens aller reaktiven Gruppen auch die Aktivitätsausbeute des Immobilisates am höchsten ist.

Diese Erwartung konnte durch den experimentellen Befund bestätigt werden.

In Abbildung 4 ist die Abhängigkeit der Aktivität der Polymer-Cell-Konjugate von dem molaren Verhältnis der Aldehydgruppen im Vernetzer zu den PEI-Monomereinheiten dargestellt.

Abbildung 4

Abhängigkeit der Aktivität immobilisierter *C. simplex* Zellen
von der Vernetzermenge



Es zeigte sich, daß im Falle des Glutaraldehyds 0,6 Mol und im Falle des Polyacroleins 0,8 Mol Aldehydgruppen pro Monomereinheit die besten Ergebnisse lieferten. Alle weiteren Versuche wurden mit diesen Vernetzerkonzentrationen durchgeführt.

3.1.2. Einschluß von Corynebacter. simplex und Bacillus sphaericus Zellen in Acrolein-N-vinylpyrrolidon-Copolymere

3.1.2.1. Herstellung und Eigenschaften des Copolymeren

Aufbauend auf den Erfahrungen mit Polyacrolein als vernetzendem Reagenz bei der Einschließung von Mikroorganismen wurde nunmehr versucht, ein Acrolein-Einheiten enthaltendes Copolymeres herzustellen, das wasserlöslich und über die freien Aldehydgruppen vernetzbar sein sollte.

Als in diesem Sinne geeigneter Copolymerisationspartner für das Acrolein wurde 1-Vinyl-2-pyrrolidon (NVP) gefunden. Diese Copolymere sind in der Literatur erstaunlicherweise nur wenig beschrieben. R. C. Schulz et al. untersuchten zwar das Copolymerisationsverhalten des Acroleins mit verschiedenen Vinylmonomeren, jedoch nicht mit NVP (70, 71, 72).

1960 wurde ein Patent auf die Herstellung des Copolymeren aus Acrolein und NVP in wässriger 3,85 %iger Lösung und dessen Verwendung in der Papierindustrie erteilt (73).

Weiterhin wurden wasserlösliche physiologisch aktive Polymere durch die Bindung von Enzymen (74) oder Antibiotica (75) an das Copolymerere hergestellt.

In vernetzter Form wurde das Copolymerere zur Immobilisierung von Trypsin eingesetzt (76).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Copolymerisation unter Bedingungen ähnlich der Polymerisation von Acrolein (65) in wässriger Lösung durchgeführt, jedoch nur mit Kaliumperoxydisulfat als Initiator anstatt Kaliumperoxydisulfat/Silbernitrat. Als Konzentrationen wurden gewählt: Monomere (gesamt) 2 Mol/l und Initiator 40 mMol/l.

Die Reaktion wurde zunächst bei 70° C durchgeführt, wobei ein unlösliches Gel entstand. Erst ein 24 stündiges Rühren bei Raumtemperatur führte zu dem gewünschten löslichen Copolymeren.

Die Reaktionsansätze wurden zunächst mit dem Ziel gewählt, Copolymere mit verschiedenen Zusammensetzungen zu erhalten. Es zeigte sich jedoch, wie in Tabelle 1 dargestellt, daß die Zusammensetzung des Produktes unabhängig vom Verhältnis der

eingesetzten Monomeren immer nahezu einem 1 : 1 Copolymeren entsprach.

Tabelle 1

Copolymerisation von Acrolein mit NVP (Reaktionsansätze).

Nr	Reaktionsansatz (Monomere in 200ml Lsg.)		Ausbeute* (%)	Aldehyd- gruppen- gehalt** (mMol/g)	Molprozent Acrolein im Copolymerisat (%) ***
	Acrolein(Mol)	NVP(Mol)			
1	0,08	0,32	23	4,67	46,4
2	0,10	0,30	30	4,99	47,6
3	0,12	0,28	31	5,04	47,4
4	0,14	0,26	39	5,08	48,4
5	0,16	0,24	42	5,32	49,2
6	0,18	0,22	65	5,65	50,2

* bezogen auf NVP

** ermittelt durch Oximtitration

*** berechnet aus dem Stickstoffgehalt

Reaktionsansätze mit mehr als 45 Molprozent Acrolein in der Monomeren-Einwaage führten zu wasserunlöslichen Copolymeren. Die Gemische wurden nach Beendigung der Reaktionszeit drei Tage gegen destilliertes Wasser dialysiert, wobei eine wässrige Lösung mit einem Gehalt von 34,17 mg Copolymerem pro ml Lösung (Ansatz Nr. 6) entstand.

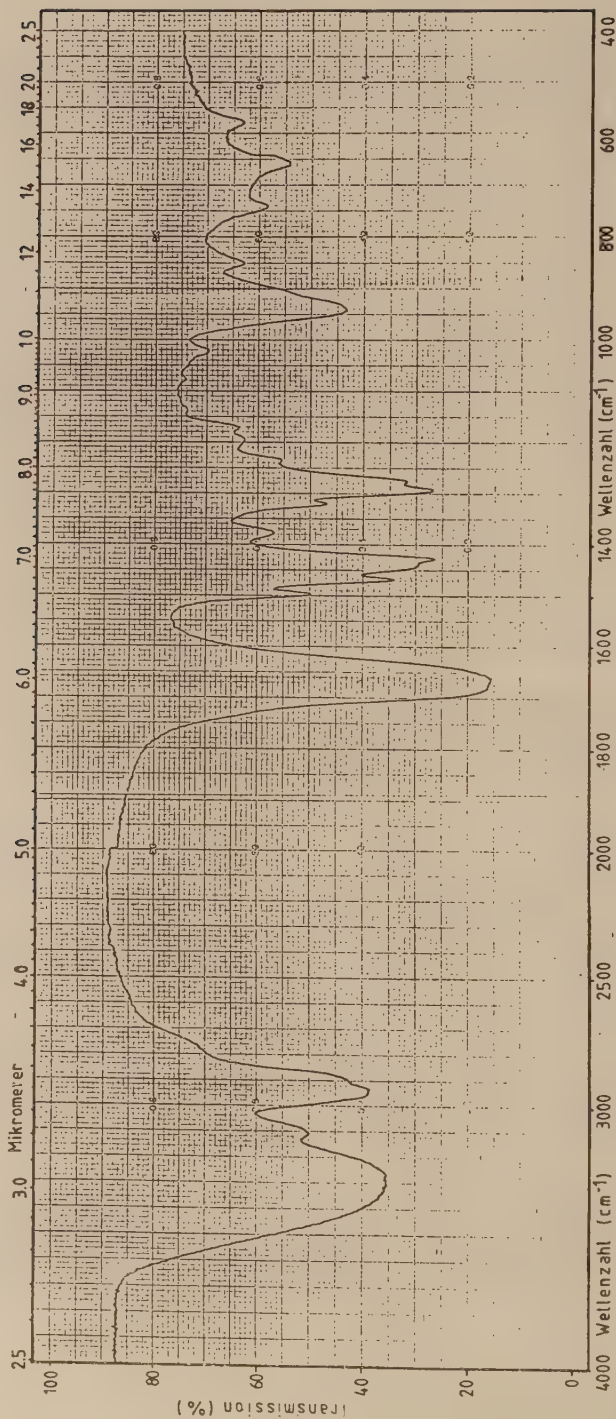
Ein Teil der Lösung wurde lyophilisiert. Dabei stellte sich heraus, daß die getrockneten Copolymeren sich nicht mehr vollständig in Wasser lösen ließen.

Für die Immobilisierungsreaktionen wurde daher die ursprüngliche wässrige Lösung verwendet.

Von den getrockneten Copolymeren wurde ein IR-Spektrum aufgenommen. Dazu wurden 1,54 mg Substanz mit 300 mg KBr verrieben und zu einem Preßling von 1 mm Dicke gepreßt. Das Spektrum

Abbildung 5

IR-Spektrum von Poly(acrolein-co-NVP)



(Abbildung 5) zeigt zwischen 3700 cm^{-1} und 3050 cm^{-1} eine breite Bande, die anhaftendem Wasser zuzuordnen ist, das auch durch scharfes Trocknen nicht ganz aus den Proben entfernt werden konnte.

Die Banden zwischen 3050 cm^{-1} bis 2800 cm^{-1} sind -C-H Valenzschwingungen zuzurechnen.

Zwischen 1800 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} tritt eine starke Adsorption auf, die einer Überlagerung der Banden der Carbonylschwingungen der Aldehydgruppe mit einem Maximum bei 1730 cm^{-1} (77) und der Carbonylgruppe des Pyrrolidonringes mit einem Maximum bei 1650 cm^{-1} (77) entsprechen. Die Banden zwischen 1540 cm^{-1} sind C-H-Deformationsschwingungen, zwischen 1350 cm^{-1} und 1200 cm^{-1} C-N-Valenzschwingungen zuzuordnen.

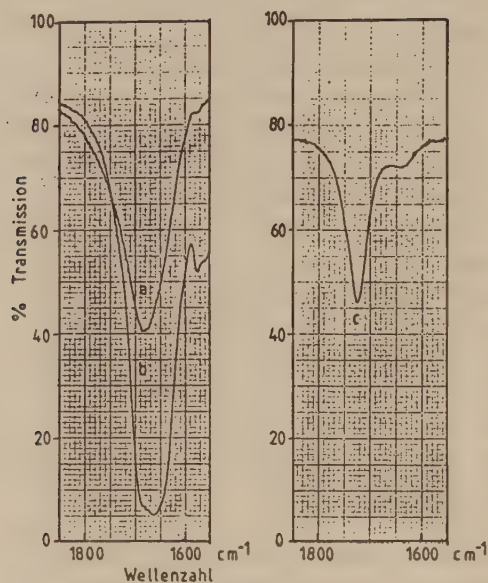
Wie aus Untersuchungen von Schulz bekannt ist, tritt im IR-Spektrum von Polyacrolein zwischen 1150 cm^{-1} und 950 cm^{-1} eine starke Adsorption auf, die auf dem Vorhandensein von Ätherbrücken beruht. Da derartige Ätherbrücken aus benachbarten Aldehydgruppen des Polyaldehyds entstehen (68), die entsprechenden Banden im Spektrum des Poly(acrolein-co-NVP) nicht vorhanden sind, gibt es Grund zu der Annahme, daß die Aldehydgruppen im Copolymeren isoliert stehen.

Parallel zur Abnahme der Ätherbrückenbanden im Spektrum des Copolymerisates sollte es zu einer Zunahme der Aldehyd-Schwingung kommen. Bedauerlicherweise läßt sich dieser Effekt nicht unmittelbar ablesen, da im fraglichen Frequenzbereich ebenfalls die Carbonylbande des NVP erscheint. Ein Vergleich der Bandenintensität im Copolymerisat sollte jedoch möglich sein, wenn es gelänge, den Anteil der Absorption, der auf das tert. Amid des NVP entfällt, von der GesamtabSORPTION zu subtrahieren.

Zu diesem Zweck wurden im interessierenden Wellenlängenbereich drei IR-Spektren aufgenommen, und zwar vom Copolymerisat und von den beiden Homopolymerisaten, wobei die Konzentrationen an Wiederholungseinheit jeweils gleich waren (Abbildung 6).

Abbildung 6

Ausschnitt aus den IR-Spektren von Poly(acrolein-co-NVP) und den beiden Homopolymeren



a: Poly-NVP
b: Poly(acrolein-co-NVP)
c: Polyacrolein

Um quantitative Aussagen machen zu können, wurden aus den gemessenen Intensitäten zunächst die Extinktionen gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz $E = \lg(I_0/I)$ berechnet, wobei für I_0 die Durchlässigkeit der Grundlinie und für I die Durchlässigkeiten beim Absorptionsmaximum eingesetzt wurden.

Es ergaben sich folgende Werte:

Probe	I_0 (%)	I (%)	E
Poly(acrolein-co-NVP)	85	5	1,23
Poly(NVP)	85	40	0,33
Poly(acrolein)	77	46	0,22

Aus der Differenz ergibt sich für die Extinktion der Aldehyd-Gruppen im Copolymeren ein Wert von 0,90. Bei gleichem Gehalt an Acrolein sind also im Copolymerisat viermal mehr Aldehyd-Gruppen vorhanden als im Homopolymerisat, wo die Extinktion nur 0,22 beträgt. Dieser Befund deutet ebenfalls auf das Vorhandensein isolierter Acrolein-Bausteine im Copolymerisat hin.

Da außerdem gefunden wurde, daß die analytisch ermittelte Zusammensetzung des Copolymerisates einem molaren Verhältnis von Acrolein zu NVP wie 1 : 1 entsprach, und dieses Molverhältnis nahezu unabhängig von der Zusammensetzung des Monomergemisches war (wie in Tabelle 1 angegeben), wird angenommen, daß Acrolein und NVP unter den angegebenen Bedingungen alternierend copolymerisieren.

Für diesen Sachverhalt sprechen noch zwei weitere Befunde:

1. Ein Gemisch aus äquimolaren Mengen von Acrolein und NVP in wässriger Lösung polymerisierte spontan innerhalb von wenigen Stunden, während die einzelnen Komponenten für sich allein ein solches Verhalten nicht zeigten.

2. Das Copolymerisationsverhalten läßt sich aus den Q- und e-Werten von Alfrey und Price (78) voraussagen.

Aus dem Polymer Handbook (79) wurden folgende Werte entnommen:

	e	Q
NVP	- 1,14	0,14
Acrolein	0,73	0,85

Laut Elias (80) können Monomere mit etwa gleichen Q-Werten gut copolymerisieren, wobei gleiche e-Werte zu einer ideal azeotropen, weit verschiedene e-Werte zu einer alternierenden Copolymerisation führen. Letzteres trifft im vorliegenden Fall zu.

3.1.2.2. Vernetzungsversuche an Acrolein-NVP-Copolymeren

Eine Vernetzung der Copolymeren-Lösung in Gegenwart von Corynebacter. simplex Zellen wurde zunächst mit Diaminen versucht,

und zwar mit 1,6 Diaminohexan, 1,4 Diaminobutan, p-Phenyl-endiamin und außerdem Polyethylenimin.

In allen Fällen zeigte es sich, daß eine Vernetzung erst bei einem relativ hohen pH-Wert erfolgte, der etwa dem pK_a -Wert der Amine entsprach. Dies führte zu einem Aktivitätsverlust. Als weiterer Nachteil kam hinzu, daß die Vernetzungsreaktion außer beim Polyethylenimin reversibel war. Die Immobilisate lösten sich bei neutralem pH-Wert langsam wieder auf und gaben die eingeschlossenen Zellen wieder frei.

Da es sich bei der Vernetzungsreaktion um eine Schiffsche Basen-Bildung handelt, war die Reversibilität nicht weiter verwunderlich. Sie konnte durch eine Hydrierung mit Natriumborhydrid verhindert werden.

Wegen der schlechten Aktivitätsausbeuten wurde diese Möglichkeit der Vernetzung jedoch nicht weiter verfolgt.

Da bekannt ist, daß Aldehyd-Gruppen mit Hydroxylamin und auch mit am Sauerstoff substituierten Hydroxylaminen in neutralem oder schwach saurem Medium irreversibel unter Bildung von Oximen reagieren können, wurde nun der Plan gefaßt, zur Vernetzung bifunktionelle Dioxydiamine IV einzusetzen, die gemäß folgendem Reaktionsschema (Abb. 7) mit dem Acrolein-NVP-Copolymerem reagieren sollten.

Im einzelnen wurden folgende Vernetzer synthetisiert und auf ihre Eignung hin untersucht (Tab. 2):

Tabelle 2

Dargestellte Vernetzer mit folgender Grundstruktur: $H_2ON-R-OH_2$
Gruppe A: Vernetzer mit Alkylen-Einheiten

R =	Name	Kurzzeichen
$-C_8H_{16}-$	1,8-Di(oxyamino)-octan	DOA 8
$-C_6H_{12}-$	1,6-Di(oxyamino)-hexan	DOA 6
$-C_4H_8-$	1,4-Di(oxyamino)-butan	DOA 4
$-C_3H_6-$	1,3-Di(oxyamino)-propan	DOA 3
$-C_2H_4-$	1,2-Di(oxyamino)-ethan	DOA 2

Fortsetzung von Tabelle 2

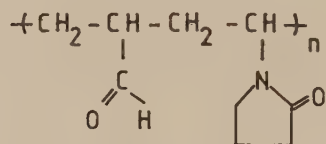
Gruppe B: Vernetzer mit Ethoxy-Einheiten

R =	Name	Kurzzeichen
$-C_2H_4OC_2H_4-$	1,5-Di(oxyamino)-3-oxa-pentan	DOAO 5
$-C_2H_4(OC_2H_4)_2-$	1,8-Di(oxyamino)-3,6-dioxa-octan	DOADO 8
$-C_2H_4(OC_2H_4)_3-$	1,11-Di(oxyamino)-3,6,9-trioxa-undecan	DOATO 11
$-C_2H_4(OC_2H_4)_4-$	1,14-Di(oxyamino)-3,6,9,12-tetraoxatetradecan	DOATO 14

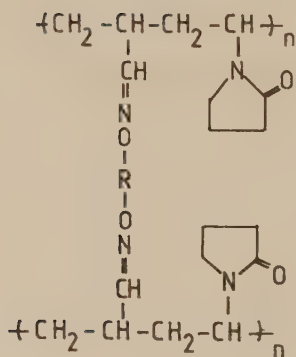
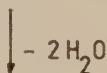
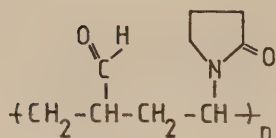
Sämtliche, zum größeren Teil noch nicht beschriebene Verbindungen, wurden zunächst in Form der leichter zu reinigenden Dihydrochloride hergestellt.

Abbildung 7

Vernetzung von Poly(acrolein-co-NVP) mit Dioxydiaminen



IV



3.1.2.3. Darstellung der Vernetzer

Obwohl in der Literatur viele Synthesewege vorgeschlagen werden, um O-substituierte Hydroxylamine herzustellen (81), sind nur wenige dieser Methoden geeignet, zu Dioxydiaminen zu gelangen.

Soweit bekannt ist, sind bisher nur zwei Möglichkeiten erfolgreich geworden:

1. Die Methode von Fuller und King (82):

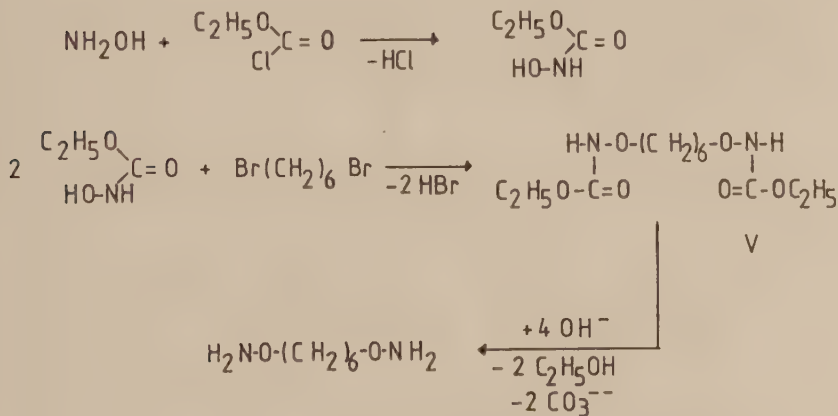
Zunächst wird aus Hydroxylamin und Chlorameisensäure-ethylester Hydroxycarbamidsäure-ethylester hergestellt.

Das Hydroxyurethan wird mit 1,6-Dibromhexan O-alkyliert.

Aus dem Zwischenprodukt V entsteht dann durch alkalische Hydrolyse das gewünschte 1,6-Di(oxyamino)-hexan in 51 %iger Ausbeute (Abbildung 8).

Abbildung 8

Darstellung von 1,6-Di(oxyamino)-hexan nach der Methode von Fuller und King

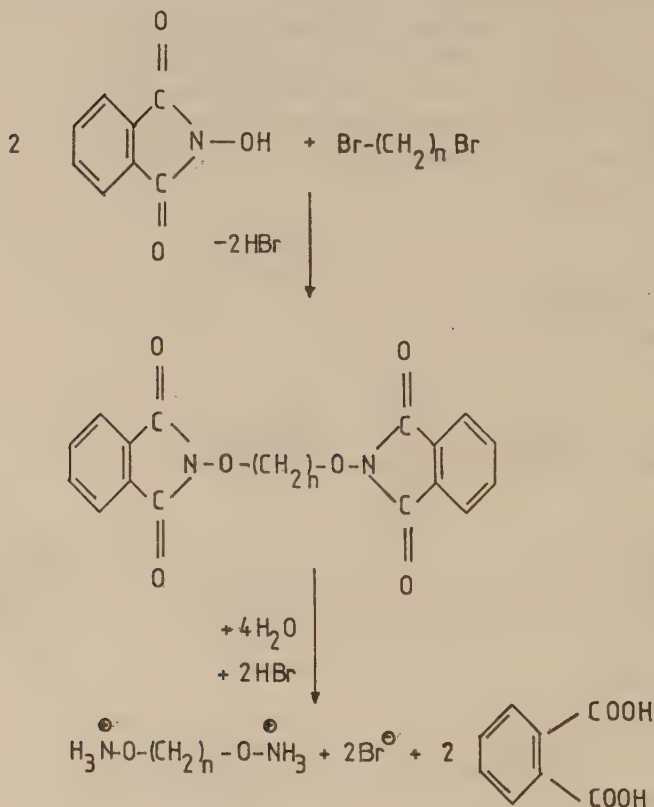


2. Die Methode von Bauer und Suresh (83):

In diesem Fall wird N-Hydroxyphthalimid mit verschiedenen ω, ω' -Dibromalkanen umgesetzt. Die Hydrolyse der ω, ω' -Bis(phthalimidooxy)alkane zu den entsprechenden Bis(aminooxy)alkyldihydrobromiden erfolgte mit 48 %iger Bromwasserstoffsäure (Abbildung 9).

Abbildung 9

Darstellung von Di(oxyamino)alkan-dihydrobromiden nach der Methode von Bauer und Suresh



Dargestellt wurden Verbindungen mit $n = 2, 3, 4, 5$ und 6 . Die Ausbeuten betrugen zwischen 2 und 21% .

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Vernetzer DOA 6 (siehe Tabelle 2) wurde nach der von Fuller und King angegebenen Vorschrift hergestellt.

Das bisher in der Literatur nicht beschriebene 1,8-Di(oxyamino)-octan DOA 8 konnte in analoger Weise in 23,2 %iger Ausbeute erhalten werden.

Für die Herstellung von DOA 4 und DOA 2 wurde auf die Methode von Bauer und Suresh mit der Änderung zurückgegriffen, daß die als Zwischenprodukt auftretenden Di(phthalimidooxy)alkane statt mit HBr mit HCl verseift wurden, um gleich zu den entsprechenden Hydrochloriden der Dioxydiamine zu gelangen.

Die bisher aufgeführten Vernetzer enthalten als Grundgerüst eine Alkankette $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, während die anderen Vernetzer aus Tabelle 2 (Gruppe B) aus Oxyethylen-Einheiten $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ aufgebaut sind.

Es wurde zunächst versucht, die Vernetzer der Gruppe B auch analog der für Gruppe A angewendeten Verfahren herzustellen. Ausgehend von Di-, Tri- und Tetraethylenglycol wurden diese zunächst mit HBr bromiert, wobei jedoch als Hauptprodukt in allen Fällen 2,2'(Dibromethyl)-ether entstand.

Günstiger war die Herstellung der Tosylate der verschiedenen Ethylenglycole, wie sie von Dale und Kristiansen (84) beschrieben wird, welche dann anstelle der Bromide mit Hydroxycarbaminsäure-ethylester umgesetzt wurden. Auf diese Weise konnten die Vernetzer DOAO 5 und DOADO 8 in 15 bzw. 11 %iger Ausbeute hergestellt werden.

Mit Tetra- und Pentaethylenglycol versagte diese Methode.

Für die Herstellung der Vernetzer der Gruppe B in Tabelle 2 erwies sich eine Methode als praktikabel, die zuerst von Theilacker und Ebke (85) zur Herstellung verschiedener O-Alkylhydroxylamine $\text{R}-\text{ONH}_2$ angewandt wurde. Die Autoren gingen den einfachsten und direktesten Weg, indem sie ein Alkoholat mit Chloramin NH_2Cl umsetzten.

Eine Anwendung dieser Methode machte die Vernetzer der Gruppe B bequem zugänglich.

Es wurde zunächst eine ätherische Lösung von Chloramin hergestellt, indem man eine handelsübliche Natriumhypochloridlösung in Gegenwart von Äther mit der äquivalenten Menge Ammoniaklösung

sung in der Kälte unter starkem Rühren miteinander reagieren ließ. Mindestens die Hälfte des dabei gebildeten Chloramins wanderte in die Ätherphase, die abgetrennt und über Kalziumchlorid getrocknet wurde.

Diese Methode der Chloraminherstellung geht auf Marckwald und Wille zurück (86).

Der Gehalt der Lösung an Chloramin wurde jodometrisch bestimmt. Die Umsetzung des Chloramins mit dem Bis-Alkoholat des Ethylen-glycols erfolgte nach zwei verschiedenen Varianten.

Variante A

Die Bis- Alkoholate wurden aus den entsprechenden Oligoethylen-glycolen $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ mit $n = 1, 2, \dots 5$ und metallischem Natrium in ter. Butanol als Lösungsmittel hergestellt und mit der Chloramin-Lösung 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Variante B

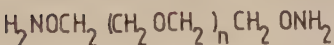
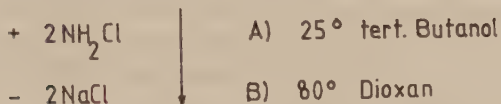
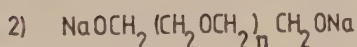
Die Bis-Alkoholate wurden wie bei A, aber mit Dioxan als Lösungsmittel hergestellt. Die Chloramin-Lösung wurde in der Hitze zuge-
getropft, wobei das Reaktionsgemisch bei 80°C gehalten wurde. Dabei destillierte der Äther über eine Kolonne ab.

Für ein Gelingen der Reaktion war es notwendig, stets mit einem Unterschuß an Chloramin zu arbeiten; so wurden pro Mol Ethylen-glycol 1,6 Mol Chloramin eingesetzt.

Eine Reinigung der Rohprodukte erfolgte, indem diese zunächst mit verdünnter HCl angesäuert wurden. Nach dem Eindampfen und Trocknen konnten aus dem öligen Rückstand durch Behandeln mit Chloroform farblose Kristalle der Di(oxyamin)-Dihydrochloride gewonnen werden, während die Nebenprodukte wie z. B. monosubstituierte Spezies in Lösung verblieben.

Einen Überblick über den Syntheseweg mit Chloramin gibt die Abbildung 10.

Abbildung 10: Synthese von Vernetzern durch Reaktion mit Chloramin



$$n = 0, 1, 2, 3, 4$$

Es wurden Ethylenglycol, Di-, Tri-, Tetra- und Pentaethylen-glycol mit Chloramin umgesetzt, wobei die Dihydrochloride der entsprechenden Di(oxyamine) in Ausbeuten von 50 bis 60 % (be-zogen auf Chloramin) erstmalig dargestellt werden konnten. Auch einige Alkylendioxydiamine konnten auf diese Weise herge-stellt werden, indem 1,3-Propandiol und 1,4-Butandiol mit Chloramin umgesetzt wurden.

Die dargestellte Methode ist also vielseitig, einfach in der Durchführung und kostensparend, da billige Rohstoffe verwendet werden. Lösungsmittel und nicht umgesetzte Ausgangsverbindun-gen lassen sich leicht zurückgewinnen, da die Reaktion im we-sentlichen in einem einzigen Schritt verläuft.

3.1.2.4. Eigenschaften der Dioxydiamine, die ihre Eignung als Vernetzer beeinflussen

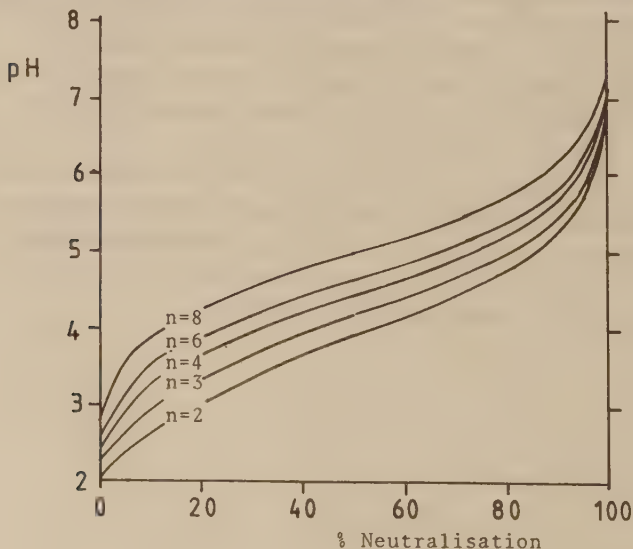
Eine der Voraussetzungen für die Eignung der Dioxydiamine als Vernetzer bei der Immobilisierung von Mikroorganismen ist ihre schnelle Reaktion mit dem Acrolein-NVP-Copolymeren, um eine eventuelle Schädigung der Zellen entweder durch reaktive Aldehyd-Gruppen des Polymeren oder durch den Vernetzer selbst so gering wie möglich zu halten. Weiterhin sollen die Polymer-Zell-Konjugate ausreichende mechanische Festigkeit besitzen, wobei das polymere Netzwerk so beschaffen sein sollte, daß die Mikroorganismen fixiert werden, Substrat und Produkt aber möglichst ungehindert diffundieren können.

Eine schnelle Vernetzungsreaktion war nur zu erwarten, wenn alle Reaktanden wasserlöslich sind.

Es wurde das Säure-Base Verhalten der verschiedenen Dioxydiamine untersucht, indem deren Di-Hydrochloride mit Natronlauge titriert und dabei die Löslichkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert getestet wurde.

Die Titrationskurven der Alkylendioxyamine sind in Abbildung 11 wiedergegeben.

Abbildung 11 Titrationskurven der Vernetzer (Gruppe A)



Wie aus den Wendepunkten bei Halbneutralisation entnommen werden kann, steigen die pK_S -Werte mit wachsenden Kettenlängen (Tabelle 3).

Tabelle 3

pK_S -Werte der Alkylendioxydiamine $H_2NO(CH_2)_nONH_2$

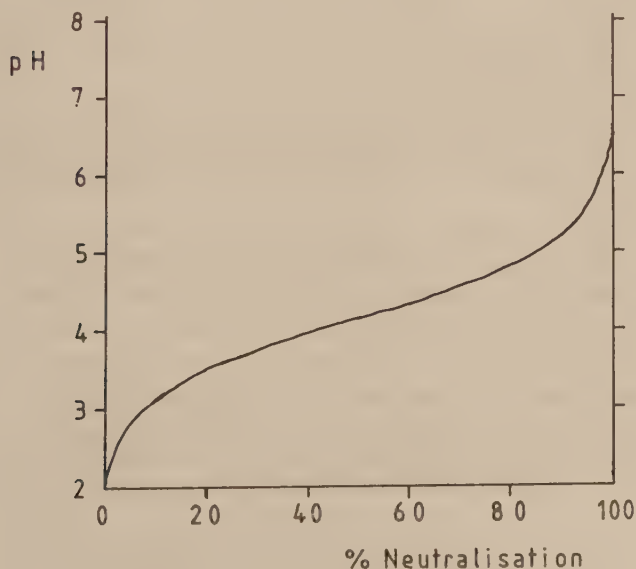
n	pK_S
2	3,90
3	4,20
4	4,40
6	4,60
8	4,95

Die Verbindungen DOA 2, DOA 3 und DOA 4 sind im gesamten pH-Bereich wasserlöslich, während DOA 6 und DOA 8 oberhalb von $pH = 6$ auszufallen beginnen.

Die Vernetzer auf der Basis von Ethylenglycolen sind alle im gesamten pH-Bereich wasserlöslich. Ihre Titrationskurven unterscheiden sich nur wenig voneinander (Abbildung 12), ihr pK_S -Wert beträgt 4,15.

Abbildung 12

Titrationen der Vernetzer (Gruppe B) am Beispiel DOAD08



Alle Vernetzer mit Ausnahme von DOA 6 und DOA 8 konnten bei neutralem pH-Wert eingesetzt werden.

DOA 6 und DOA 8 wurden in Form ihrer wasserlöslichen Mono-Hydrochloride angewendet. Da in diesem Fall während der Vernetzungsreaktion Salzsäure frei wurde, mußte ein zu starkes Absinken des pH-Wertes durch nachträgliche Zugabe von Phosphat-Puffer verhindert werden. Es zeigte sich jedoch, daß ein kurzzeitiges Auftreten von pH-Werten zwischen 1 und 2 keinen nachteiligen Einfluß auf die Aktivität der Immobilisate ausübte.

In Vorversuchen wurde die optimale Menge an Vernetzern pro eingesetzter Menge des Copolymeren bestimmt, d. h. diejenige Menge Vernetzer, bei der die Aldehyd-Gruppen des Copolymeren gerade abreagiert waren. Wurden Oxyaminogruppen des Vernetzers und Aldehyd-Gruppen des Copolymeren gerade im äquimolaren Verhältnis zueinander eingesetzt, konnten nach einstündiger Reaktionsdauer durch Oximtitration (siehe experimenteller Teil) keine freien Aldehyd-Gruppen mehr nachgewiesen werden. Der Versuch wurde mit dem Vernetzer DOA 8 durchgeführt. Die Ergebnisse wurden auf alle anderen Vernetzer übertragen.

Während aller Immobilisierungsversuche wurden Vernetzer und Copolymeres (Wiederholungseinheit) im molaren Verhältnis von 1 : 2 eingesetzt.

3.1.2.5. Immobilisierungsversuche

Die Einschließung von *Corynebacter. simplex* und *Bacillus sphaericus* Zellen erfolgte analog dem in Kapitel 3.1.1. beschriebenen Verfahren mit PEI.

Die Reaktionsansätze wurden so gewählt, daß Zellgehalte der Immobilisate von 40 % bis 50 % entstehen sollten. Die Poly-(acrolein-co-NVP)-Lösung wurde zunächst mit den Zellen gemischt und glattgerührt, worauf die Immobilisierung durch Zugabe einer Lösung des Vernetzers erfolgte. Die Vernetzerlösung war vorher auf den gewünschten pH-Wert eingestellt worden, und zwar für DOA 6 und DOA 8 auf pH = 4,5 bis 5,0, sonst auf pH = 7. Für eine ausreichende mechanische Festigkeit der Immobilisate

hatte es sich als notwendig erwiesen, bestimmte Mindestkonzentrationen einzuhalten. So betrug die Konzentration des Copolymeren mindestens 30 mg/ml und die Vernetzerkonzentration 0,5 mMol/ml.

Die Vernetzungsreaktion verlief innerhalb von wenigen Sekunden, wobei die Alkylendioxydiamine etwas langsamer reagierten als die Vernetzer auf der Basis von Polyethylenglycolen.

Die Immobilisate fielen als hellbraune, bröcklige Masse an, die grob zerkleinert und naß gesiebt wurde. Siebfraktionen zwischen 0,1 bis 0,5 mm wurden aufgefangen und durch Absaugen in einer Fritte von überschüssiger Flüssigkeit befreit. Die Immobilisate wurden im feuchten Zustand im Kühlschrank bei 5° C aufbewahrt. Eine Gefrier Trocknung der Biokatalysatoren führte in einigen Fällen zu einer Aktivitätsverminderung und wurde daher vermieden.

3.1.3. Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Aktivität der immobilisierten Corynebacter. simplex und Bacillus sphaericus Zellen erfolgte, indem die Biokatalysatoren zu einer Lösung von Hydrocortison in Phosphat-Puffer gegeben und der zeitliche Verlauf der Umwandlung des Steroids zu Prednisolon, gegebenenfalls in Anwesenheit eines Cofaktors, gemessen wurde. Dazu wurden in bestimmten Zeitabständen Proben entnommen und die Konzentrationen der Steroide bestimmt.

Unter der Annahme, daß die enzymatisch katalysierte Steroidumwandlung nach der Michaelis-Menten Kinetik verläuft, gilt für die Abnahme der Substratkonzentration folgende Gleichung (87):

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K'_m + [S]} \quad (1)$$

Dabei bedeuten:

[S] die Substratkonzentration,

$V_{\max}$ die maximale Reaktionsgeschwindigkeit,

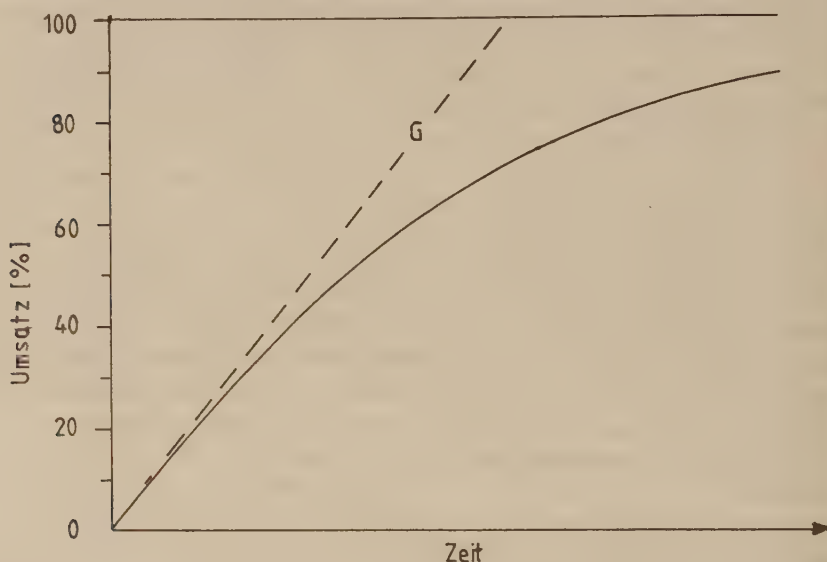
K'_m die scheinbare Michaelis-Menten Konstante und

t die Zeit.

Bei hohen Substratkonzentrationen, also zu Anfang der Reaktion, gilt $[S] \gg K_m$, damit ist $-d[S]/dt = V_{max}$. Die Reaktion verläuft also nach der 0. Ordnung, während für kleine Substratkonzentrationen gegen Ende der Reaktion $[S] \ll K_m$ wird und wegen $-dS/dt = [S] \cdot V_{max}/K_m$ eine Reaktion 1. Ordnung vorliegt. Da die Abnahme der Substratkonzentration gleich der Zunahme der Produktkonzentration ist, gilt für die Bildung von Prednisolon eine Zeitabhängigkeit, wie sie in Abbildung 13 skizziert ist.

Abbildung 13

Zeitlicher Verlauf der Prednisolon-Bildung



Aus der Steigung $a = \% \text{Umsatz}/t$ der Geraden G durch den linearen Anfangsteil der Kurve und der Masse m des Biokatalysators (Immobilisats) wurde seine Aktivität A_{Imm} nach der Gleichung

$$A = \frac{a \cdot c_{HC}}{100 \cdot m} \quad \left[\frac{\mu \text{ Mol}}{\text{g} \cdot \text{h}} \right]$$

berechnet. c_{HC} ist die Anfangskonzentration des Hydrocortisons. In ähnlicher Weise wurde auch die Aktivität der nativen Mikroor-

ganismen berechnet, wobei für m die Trockenmasse der Zellen eingesetzt wurde.

Aus der Aktivität der Immobilisate A_{Imm} , dem in g/g ausgedrückten Zellgehalt Z der Immobilisate und der Aktivität der nativen Zellen A_{nat} wurde die Aktivitätsausbeute AA ausgerechnet, die ein direktes Maß für die Überlebensrate der Zellen während der Immobilisierungsreaktion darstellt.

$$AA = \frac{A_{Imm}}{Z \cdot A_{nat}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (3)$$

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß der Begriff "Aktivitätsausbeute", wie er in dieser Arbeit gebraucht wird, sich nur auf die erste gemessene Aktivität der Biokatalysatoren unmittelbar nach der Immobilisierung beziehen soll. Nur so erhält man eine Größe, die ausschließlich von der Immobilisierungsmethode abhängt und zu Vergleichszwecken herangezogen wird.

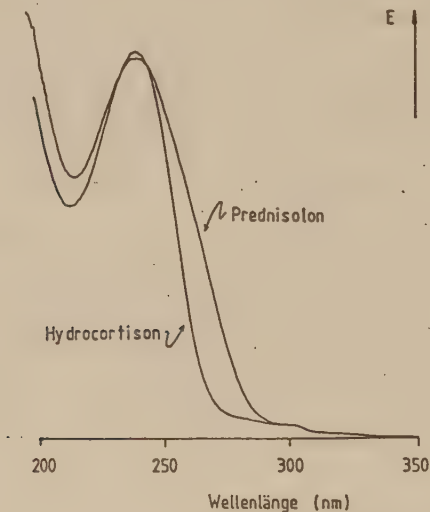
Die Bestimmung der Steroid-Konzentration wurde im wesentlichen nach zwei Verfahren durchgeführt: einer speziellen Spektralphotometrie und der Differential-Puls-Polarographie. Beide Verfahren sollen im folgenden Abschnitt kurz erläutert werden. Zur Kontrolle und zur Überprüfung der Einheitlichkeit des Reaktionsproduktes wurden vereinzelt noch die HPLC und die Dünnschichtchromatographie herangezogen.

3.1.3.1. Steroid-Bestimmung mittels Spektralphotometrie

Als schnellste und genaueste Methode der Steroid-Konzentrationsbestimmung erwies sich die UV-Spektralphotometrie. Da Hydrocortison und Prednisolon beide in demselben Wellenlängenbereich von 230 nm bis 300 nm absorbieren (Abbildung 14), war eine direkte Bestimmung der Einzelkomponenten nicht möglich.

Abbildung 14

UV-Spektren von Hydrocortison und Prednisolon



Es wurde daher eine Methode angewendet, die durch Messen der Extinktion bei zwei verschiedenen Wellenlängen und anschließender Rechnung eine Bestimmung der Steroidumwandlung erlaubte. Diese Methode sei im Folgenden erläutert. Die Extinktionen E_1 und E_2 bei den Wellenlängen λ_1 und λ_2 lassen sich für ein Zweikomponentensystem durch folgende Gleichungen ausdrücken (Gleichung 4 und 5).

$$E_1(\lambda_1) = \epsilon_{11} \cdot [\text{HC}] + \epsilon_{12} \cdot [\text{Pr}] \quad (4)$$

$$E_2(\lambda_2) = \epsilon_{21} \cdot [\text{HC}] + \epsilon_{22} \cdot [\text{Pr}] \quad (5)$$

Dabei bedeuten:

[HC] Hydrocortison-Konzentration

[Pr] Prednisolon-Konzentration

$\epsilon_{11} \dots \epsilon_{22}$ molare Extinktionskoeffizienten

Die einzelnen molaren Extinktionskoeffizienten lassen sich aus Eichlösungen der reinen Substanzen mit bekannter Konzentration bestimmen, denn für $[\text{Pr}] = 0$ gilt:

$$\epsilon_{11} = \frac{E_1}{[\text{HC}]} \quad \text{und} \quad \epsilon_{21} = \frac{E_2}{[\text{HC}]}$$

sowie für $[\text{HC}] = 0$:

$$\epsilon_{12} = \frac{E_1}{[\text{Pr}]} \quad \text{und} \quad \epsilon_{22} = \frac{E_2}{[\text{Pr}]}$$

Wir haben also mit (4) und (5) zwei Gleichungen mit zwei Unbekannten vor uns, deren Lösungen die gesuchten Konzentrationen sind, und zwar:

$$[\text{HC}] = \frac{E_1 \cdot \epsilon_{22} - E_2 \cdot \epsilon_{12}}{\epsilon_{11} \cdot \epsilon_{22} - \epsilon_{21} \cdot \epsilon_{12}} \quad (6)$$

$$[\text{Pr}] = \frac{E_2 \cdot \epsilon_{11} - E_1 \cdot \epsilon_{21}}{\epsilon_{11} \cdot \epsilon_{22} - \epsilon_{21} \cdot \epsilon_{12}} \quad (7)$$

Die spektroskopischen Messungen wurden mit einem Perkin-Elmer Spektrophotometer Modell 555 durchgeführt, wobei die gewünschten Wellenlängen vorher einprogrammiert und durch Knopfdruck abgerufen werden konnten. Für die anschließende Rechnung wurde ein programmierbarer Taschenrechner eingesetzt, so daß die

Konzentrationsbestimmung je Probe in einer Minute durchgeführt werden konnte.

Wurde die Reaktionslösung mit einer peristaltischen Pumpe über ein Sieb angesaugt und nach Passieren einer Durchflußzelle wieder zurückgepumpt, konnte auch eine kontinuierliche Verfolgung der Steroidumwandlung erfolgen.

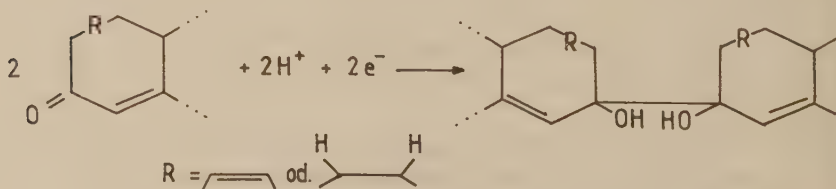
Das Verfahren ließ sich jedoch nur durchführen, wenn keine anderen Substanzen, die zwischen 230 und 300 nm absorbierten, anwesend waren. Die Genauigkeit betrug etwa $\pm 2\%$.

3.1.3.2. Steroid-Bestimmung mittels Differential-Puls-Polarographie

Polarographische Methoden werden schon seit längerer Zeit nicht nur zur Analyse von Metallionen benutzt, sondern auch zur Bestimmung organischer Substanzen.

Die Voraussetzung für dieses Analyseverfahren ist die Anwesenheit reduzierbarer Gruppen, wie sie z. B. in ungesättigten Carbonylen vorliegen. Aus diesem Grund lassen sich auch Hydrocortison und Prednisolon polarographisch bestimmen.

1956 erschienen dazu die ersten Arbeiten von Kabasakalian und Mc Glotten (89). Die Autoren nahmen für den reduktiven Elektrodenprozeß folgenden bimolekularen Mechanismus an:



Es wurde die klassische Gleichstrom-Polarographie durchgeführt. Dabei wurden folgende Halbstufenpotentiale (gemessen gegen eine 1N Kalomel-Elektrode) bei pH = 7 gefunden:

	E 1/2 (Volt)
Hydrocortison	- 1,51
Prednisolon	- 1,35

In der vorliegenden Arbeit wurde die Steroid-Bestimmung mit Hilfe der Differential-Puls-Polarographie (DPP) durchgeführt.

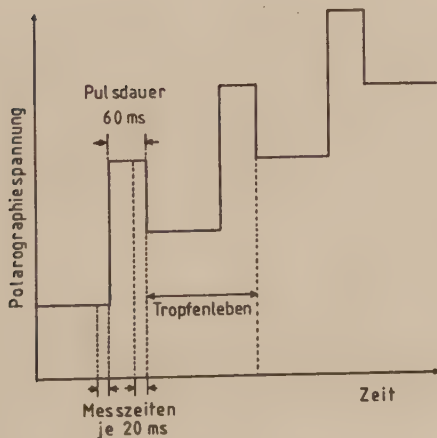
Während bei der "normalen" Polarographie an eine tropfende Quecksilberelektrode (DME) als Arbeitselektrode eine stufenweise ansteigende Gleichspannungsrampe angelegt und der zwischen der Arbeitselektrode und einer Bezugselektrode fließende Diffusionsstrom gemessen wird, unterlegt man bei der DPP jeder Spannungsstufe der Potentialrampe einen Rechteckimpuls der Größe

$E \pm 100 \text{ mV}$. Der Strom durch die Arbeitselektrode wird unmittelbar vor dem Pulsanstieg und - an demselben Quecksilbertropfen - am Schluß des Pulses während je 20 ms integriert (90).

Der Meßvorgang wird in Abbildung 15 schematisch dargestellt.

Abbildung 15

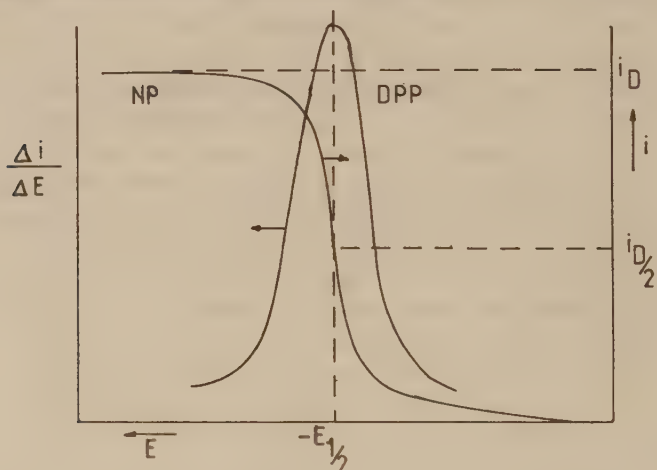
Meßmethode der Differential-Puls-Polarographie



Die Differenz der beiden Stromintegrale, die weitgehend frei ist von störenden Einflüssen wie z. B. dem Ladestrom, Wechselspannungsanteilen (positive und negative Amplituden addieren sich zu null) usw. wird als Funktion der Spannung auf dem Schreiber registriert.

In Abbildung 16 sind die "normale" Gleichstrompolarographie und die Differential-Puls-Polarographie einander gegenübergestellt.

Abbildung 16 Normal-Puls- und Differential-Puls-Polarographie



Der große Vorteil der DPP liegt darin, daß man anstelle von Stufen leichter auswertbare Peaks erhält.

Die Peakhöhe ist abhängig von der Konzentration der zu messenden Substanz (Depolarisator), wie im Folgenden mathematisch in Anlehnung an Bond et al. (91) hergeleitet werden soll.

Die Gleichung für eine reversible gleichstrompolarographische Stufe lautet

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{i_D - i}{i} \quad (8)$$

wobei i_D den Diffusionsgrenzstrom, i den Strom beim Potential E und $E_{1/2}$ das Halbstufenpotential bedeuten.

Umformen von Gleichung 8 ergibt:

$$i = \frac{i_D}{e^{mx} + 1} \quad \text{mit } m = \frac{nF}{RT} \quad \text{und} \quad x = E - E_{1/2} \quad (9)$$

Die Differentiation ergibt:

$$-\frac{di}{dE} = i_D m \frac{e^{mx}}{(e^{mx} + 1)^2} \quad (10)$$

$$\text{Für } E = E_{1/2} \text{ ist } x = 0 \text{ und } -\frac{di}{dE} = \frac{1}{4} m \cdot i_D \quad (11)$$

An dieser Stelle erreicht die Funktion $-\frac{di}{dE}$ ein Maximum. Es entsteht also ein Peak.

Da i_D auf Grund der Ilcovic-Gleichung proportional der Depolarisatorkonzentration ist, gilt das Gleiche nach Gleichung 11 auch für die Peakhöhe.

Da bei der DPP jedoch keine echte Differentiation bei unendlich kleinen dE stattfindet, sondern die Stromdifferenz bei Potentialunterschieden $\Delta E \approx 100$ mV gemessen wird, fällt die Lage des Maximums nur annäherungsweise mit dem Halbstufenpotential zusammen.

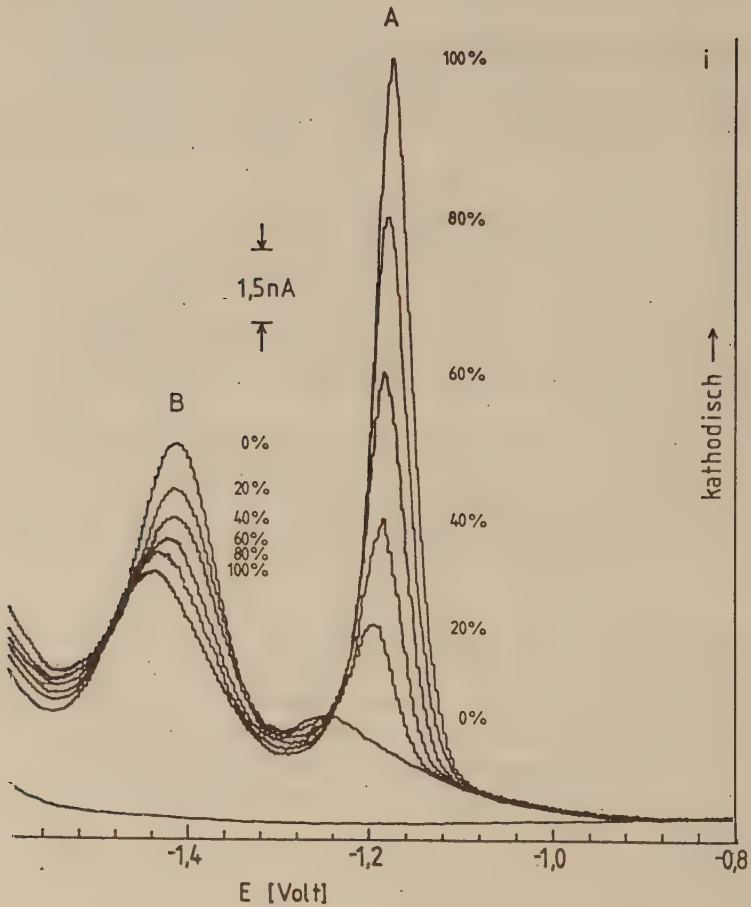
Die Abbildung 17 zeigt die Differential-Puls-Polarogramme von Mischungen aus Prednisolon und Hydrocortison, wie sie gewöhnlich bei den Steroid-Transformationen auftraten.

Der Peak A bei -1,17 V entspricht der Prednisolon-Konzentration, während der Peak B bei 1,42 V dem Hydrocortison zuzuordnen ist. Die Prozentzahlen bedeuten den Grad der Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon.

Beim Prednisolon tritt noch ein zweiter Peak bei -1,45 V auf, der dem Hydrocortison-Peak überlagert ist. Der Anteil des Prednisolons an Peak B wurde durch eine Eichung ermittelt und bei der Bestimmung der Hydrocortison-Konzentration subtrahiert. Die Genauigkeit der Bestimmung wird für Prednisolon auf $\pm 5\%$ und für Hydrocortison auf $\pm 10\%$ geschätzt.

Abbildung 17

Differential-Puls-Polarogramme für Prednisolon und Hydrocortison



Steroid-Konzentrationen insgesamt 0,1 mmol/l, wobei die Prozentzahlen den Anteil an Prednisolon angeben.

Weitere Bedingungen wie im Kapitel "Experimenteller Teil" beschrieben.

(1,5 nA = $1,5 \cdot 10^{-9}$ A)

3.1.4. Eigenschaften der immobilisierten Zellen

Da die immobilisierten Zellen als Biokatalysatoren eingesetzt werden sollen, ist ihre biologische Aktivität von essentieller Bedeutung.

Die unterschiedlichen Immobilisierungsverfahren sind daraufhin zu testen, ob beim Einschließungsprozeß die Aktivität der Zellen erhalten bleibt, und ob außerdem die Fähigkeit zur Zellteilung und damit zur Vermehrung und Reaktivierung innerhalb der Polymermatrix noch vorhanden ist. Ferner ist bei der Beurteilung der Immobilisate ihre mechanische Festigkeit zu berücksichtigen, da die Biokatalysatoren z. B. in Rührreaktoren eine hohe Standzeit haben sollen.

In den nun folgenden Kapiteln sollen die Zusammenhänge der Aktivität von verschiedenen Faktoren untersucht und qualitativ und quantitativ beschrieben werden.

Mit dem Begriff "Aktivität" soll stets die Steroid- $\Delta 1$ -dehydrogenaseaktivität gemeint sein.

Folgende Zusammenhänge sollen beschrieben werden:

- 1) Die Abhängigkeit der Aktivität von äußeren Bedingungen wie:
 - a) Zellbeladung
 - b) Temperatur und pH-Wert
 - c) Anwesenheit eines Cofaktors
 - d) Substratkonzentration
- 2) Die Abhängigkeit der Aktivität von Einflüssen, die die eingeschlossenen Zellen betreffen wie:
 - a) Enzyminduktion
 - b) Zellwachstum
- 3) Die Abhängigkeit der Aktivität von Einflüssen, die die polymere Matrix betreffen wie:
 - a) Art des Ausgangspolymeren
 - b) Art des Vernetzers
 - c) Kettenlänge des Vernetzers
 - d) Korngröße der Immobilisatorpartikel
 - e) Wassergehalt der feuchten Immobilisate
 - f) Verteilungskoeffizient des Substrats
- 4) Die Lagerstabilität der Immobilisate und die Stabilität unter Betriebsbedingungen.

Die im Folgenden beschriebenen Immobilisate sollen durch Namen bezeichnet werden, die sich aus drei verschiedenen, durch Bindestriche getrennte Kurzzeichen zusammensetzen (z. B. Copol-DOA8-C. simplex), wobei

das 1. Kurzzeichen für das Ausgangspolymere steht:

PEI = Polyethylenimin

Copol = Poly(acrolein-co-NVP)

das 2. Kurzzeichen für den Vernetzer steht:

GA = Glutaraldehyd

PA = Polyacrolein

Abkürzungen der Tabelle 2

das 3. Kurzzeichen für den Mikroorganismus steht:

C. simplex = Corynebacter. simplex

B. sphaericus = Bacillus sphaericus

Die Steroid-Umwandlungen wurden, wenn im Text nicht anders beschrieben, immer unter den gleichen Bedingungen durchgeführt:

Reaktionsgefäß: 100 ml Erlenmeyerkolben

Substratlösung: 50 ml Phosphat-Puffer (25 mMol/l Na_2HPO_4 + 25 mMol/l KH_2PO_4 , pH = 6,8) dazu wurden 0,5 ml einer 0,1 molaren Lösung von Hydrocortison in DMF gegeben, so daß die Konzentration im Test 1,0 mMol/l Hydrocortison und 1 % DMF betragen.

Reaktionsbedingungen: 30° C im Inkubationsschüttler oder Wasserbadrandschüttler bei 170 U/Min.

Einwaage der Biokatalysatoren: 150 mg native Zellen (Trockenpulver) oder 1 g Immobilisat (Feuchtmasse) der Siebfraction 0,2 - 0,5 mm.

Das Verhältnis zwischen Feuchtmasse (Feuchtgewicht und Trockengewicht wurde für jedes Immobilisat bestimmt, um die Masse der eingeschlossenen Zellen ermitteln zu können. Erst dadurch war die Bestimmung der relativen Aktivitäten der Mikroorganismen bzw. der Immobilisate möglich.

3.1.4.1. Verhältnis von Naßgewicht zu Trockengewicht der eingesetzten Immobilisate

Die Immobilisate wurden normalerweise in feuchtem Zustand eingesetzt. Um zu reproduzierbaren Bedingungen zu gelangen, war es notwendig, den Begriff "Naßgewicht" zu definieren. Unter "Naßgewicht" soll in der vorliegenden Arbeit die Masse verstanden werden, die ein mit Phosphat-Puffer benetztes Immobilisat annimmt, wenn es 30 sec über einer Glasfritte mit der Porengröße G 0 abgesaugt und dadurch von überschüssiger Flüssigkeit befreit wird.

Zur Berechnung der relativen Aktivitäten war die Kenntnis des Trockengewichtes der Immobilisate notwendig.

Aus dem Verhältnis von Naßgewicht zu Trockengewicht wurde der Wassergehalt der einzelnen Biokatalysatoren berechnet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4 Das Verhältnis von Naßgewicht zu Trockengewicht und der Wassergehalt von C. simplex-Immobilisaten

Immobilisat	<u>Naßgewicht</u>	Wassergehalt
	Trockengewicht (g/g)	
PEI-GA	5,7	82
PEI-PA	5,0	80
Copol-DOA 2	6,0	83
Copol-DOA 3	6,0	83
Copol-DOA 4	6,2	84
Copol-DOA 6	6,6	85
Copol-DOA 8	7,3	86
Copol-DOAO 5	7,0	86
Copol-DOAO 8	7,4	86
Copol-DOATO 11	8,0	87
Copol-DOATO 14	9,0	89

Der Zellgehalt der PEI-Immobilisate betrug 60 % (w/w).

Der Zellgehalt der Copol-Immobilisate betrug 50 % (w/w).

3.1.4.2. Abhängigkeit der Aktivität der Immobilisate von der Zellbeladung

Der Zellgehalt der Immobilisate konnte innerhalb weiter Grenzen variiert werden, indem bei der Durchführung der Vernetzungsreaktion unterschiedliche Zellmengen angeboten wurden. Eine Höchstgrenze war dann erreicht, wenn die Zellen durch eine zu große Anzahl die Vernetzungsreaktion verlangsamten und die Ausbildung des polymeren Netzwerkes behinderten. Es entstanden dann Gelpartikel ohne ausreichende mechanische Festigkeit, und es wurden beim anschließenden Waschprozeß Zellen aus der Gelmatrix herausgelöst.

Mechanisch stabile Immobilisate konnten bei der Verwendung von PEI mit einem Zellgehalt bis zu 80 %, bei der Verwendung von Poly(acrolein-co-NVP) bis zu 60 % hergestellt werden.

Die Aktivitätsausbeute der Immobilisate war abhängig vom Zellgehalt in der Weise, daß die relative Aktivität der eingeschlossenen Zellen um so größer war, je mehr Zellen bei der Immobilisierung angeboten wurden.

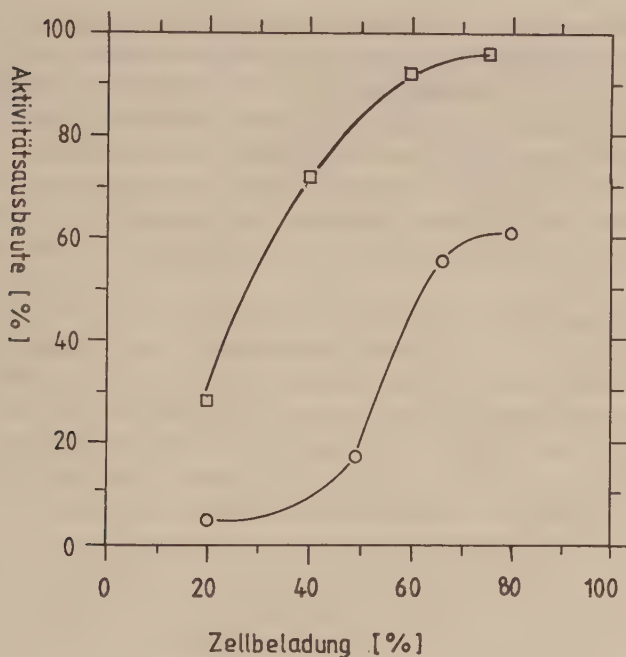
Dies wird dargestellt in Abbildung 18 für die beiden Gruppen von Immobilisaten - vernetzte PEI-Gele und vernetzte Poly(acrolein-co-NVP)-Gele.

Die höchsten Aktivitätsausbeuten konnten erzielt werden mit dem Copolymeren als Matrix, während die PEI-Immobilisate durchweg geringere Aktivitätsausbeuten lieferten. Letzteres erwies sich jedoch nicht unbedingt als Nachteil, da durch Behandeln mit Nährlösung die Aktivitäten beträchtlich gesteigert werden konnten, wie später noch gezeigt werden wird.

Für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden Immobilisate mit 50 % Zellgehalt im Falle des Copol oder 60 % im Falle des PEI hergestellt.

Abbildung 18

Abhängigkeit der Aktivitätsausbeuten von der Zellbeladung



□ = C. simplex-Copol-Oct

○ = C. simplex-PEI-GA

Reaktionsbedingungen:

je 1,0 g Naßgewicht Immobilisat, 0,5 mMol/l Hydrocortison,
0,2 mMol/l Menadion in 50 ml Phosphat-Puffer, 1 % DMF (30° C).

3.1.4.3. Abhängigkeit der Aktivität der Immobilisate von der Temperatur und dem pH-Wert bei der Steroid-Umwandlung

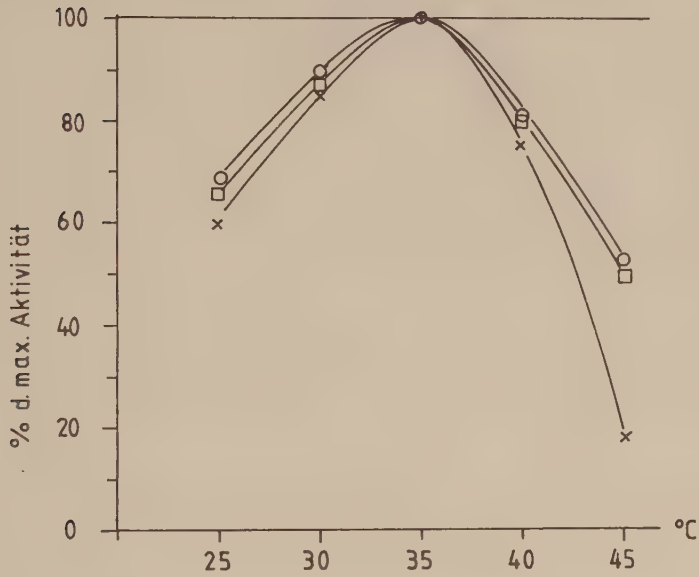
Bio-katalysatoren sind im allgemeinen empfindliche Substanzen, die nur in einem begrenzten Temperatur- und pH-Bereich ihre katalytische Aktivität optimal entfalten können und die außerhalb gewisser Toleranzgrenzen irreversibel geschädigt werden. Von den immobilisierten Enzymen ist bekannt, daß durch den Immobilisierungsprozeß eine Stabilisierung des Enzyms bei Temperaturerhöhung hervorgerufen wird und daß gegenüber dem freien Enzym ein verändertes pH-Profil der Aktivität zu beobachten ist (92).

Es wurde untersucht, ob die Immobilisierung ganzer Zellen durch Einschluß in vernetzte Gele einen ähnlich stabilisierenden Effekt ausüben kann und in welchem Temperatur- und pH-Bereich die besten katalytischen Eigenschaften gefunden werden. Dazu wurden in zwei Meßreihen 150 mg (Trockengewicht) freie und 1 g (Naßgewicht) immobilisierte *C. simplex* (Copol-DOA8- und PEI-GA-*C. simplex*) zu Steroid-Umwandlungen eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen waren so, wie in Kapitel 3.1.4. (Seite 52) beschrieben, jedoch wurde in einem Fall die Temperatur zwischen 25° C und 45° C variiert und im anderen Fall der pH-Wert durch Zugabe von 1N HCl oder 1N NaOH auf Werte zwischen 5 und 8 eingestellt.

Die Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivitäten der immobilisierten Zellen wurden mittels Spektralphotometrie, der freien Zellen mittels Differential-Puls-Polarographie bestimmt. Sie wurden in % der max. Aktivitäten ausgedrückt und in Abhängigkeit von der Temperatur und dem pH-Wert dargestellt (Abbildungen 19 und 20).

Abbildung 19

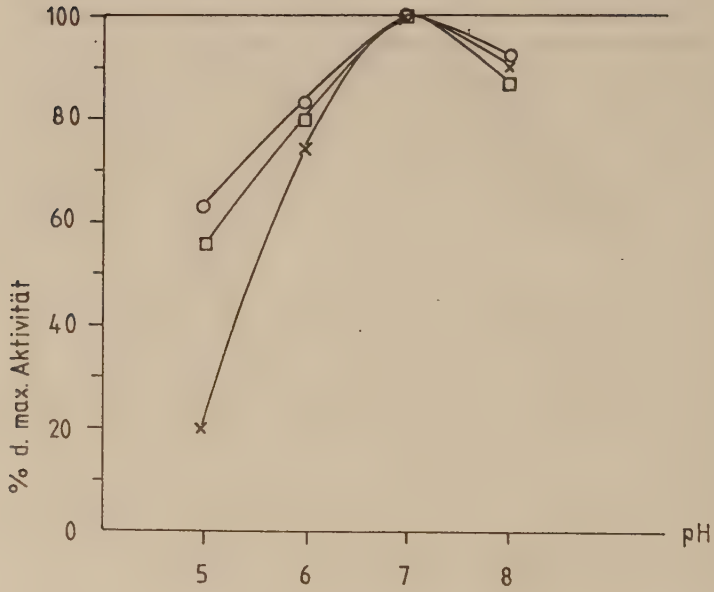
Abhängigkeit der Aktivität von der Temperatur



- x = freie C. simplex
- o = Copol-DOA8-C. simplex
- = PEI-GA-C. simplex

Abbildung 20

Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert



- x = freie C. simplex
- o = Copol-DOA8-C. simplex
- = PEI-GA-C. simplex

Es wurde gefunden, daß sowohl freie als auch immobilisierte *C. simplex* Zellen ein Temperatur-Optimum der Aktivität bei 35° C besitzen. Oberhalb dieser Temperatur fiel die Aktivität ab, was auf eine irreversible Schädigung des Enzymsystems zurückzuführen war. Bei einer Temperatur von 45° C war die Aktivität der freien Zellen bis auf 20 % der Ausgangsaktivität gesunken, während die trägerfixierten Zellen noch 50 % ihrer Aktivität behalten hatten. Es wurde also auch im Falle der immobilisierten Zellen eine gegenüber den freien Zellen verbesserte Thermostabilität gefunden.

Das pH-Optimum der $\Delta 1$ -Dehydrogenase-Aktivität lag für die immobilisierten Zellen ebenso wie für die freien *C. simplex* bei pH = 7. Im sauren Bereich zeigten die freien Zellen einen höheren Aktivitätsverlust als die trägerfixierten Mikroorganismen. Auch hier scheint eine stabilisierende Wirkung durch das einschließende Medium gegeben zu sein.

Die hier gefundenen Ergebnisse stimmen gut überein mit den Untersuchungen von Omata et al. (51) sowie von Manecke und Beier (56, 57) an den dort behandelten immobilisierten *C. simplex*.

Die weiteren Steroid-Umwandlungen mit *C. simplex* wurden bei einem pH-Wert von 6,8 durchgeführt. Das ist der pH-Wert, den der verwendete Phosphat-Puffer aufweist.

Als Temperatur wurde für künftige Messungen 30° C gewählt. Das ist zwar etwas niedriger als das Temperatur-Optimum, vermeidet aber Denaturierungen bei erhöhten Temperaturen.

3.1.4.4. Abhängigkeit der Aktivität der Immobilisate von der Cofaktor-Konzentration

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, benötigt das Enzymsystem des *C. simplex* und des *B. sphaericus* zur Steroid-Umwandlung ein Coenzym, das jedoch in der intakten Zelle bereits vorhanden ist. Es handelt sich dabei vermutlich um eine Flavin-Verbindung (14).

Die Aktivität der Bakterien kann durch den Zusatz künstlicher Elektronenakzeptoren wie Menadion (Mena), Phenazin-methosul-

fat (PMS) oder 2,6-Dichlorphenolindophenol (DPIP) gesteigert werden. So konnten z. B. mit Aceton behandelte und damit inaktivierte *C. simplex* Zellen ihre Aktivität wiedererlangen, wenn künstliche Cofaktoren zugegeben wurden (93). Bei der Steroid-Umwandlung mit immobilisierten Zellen wurde der gleiche Effekt beobachtet, wobei die größten Aktivitätssteigerungen durch Menadion hervorgerufen wurden (46, 47, 53, 54).

In früheren Publikationen aus unserer Arbeitsgruppe wurde beschrieben, daß bei einer Substratkonzentration von 2,0 mMol/l Hydrocortison eine Menadionkonzentration von 0,5 mMol/l optimal war und die Aktivität der immobilisierten *C. simplex* auf das achtfache steigerte (56, 57).

Leider stehen dem Aktivitätsgewinn durch den Zusatz von Menadion schwerwiegende Nachteile gegenüber:

1. Die Halbwertszeit der Aktivität der Biokatalysatoren wird herabgesetzt.
2. Die Fähigkeit der immobilisierten Zellen zur Vermehrung oder Reaktivierung geht weitgehend verloren (47):

Diese Nachteile wurden auch bei der Verwendung von PMS und DPIP gefunden (57).

Offensichtlich werden durch die künstlichen Cofaktoren wesentliche Funktionen der Zellen beeinträchtigt.

Larsson et al. (46) machen die Bildung von Peroxiden und Superoxiden, die aus den chinoiden Verbindungen gebildet werden können (94), dafür verantwortlich.

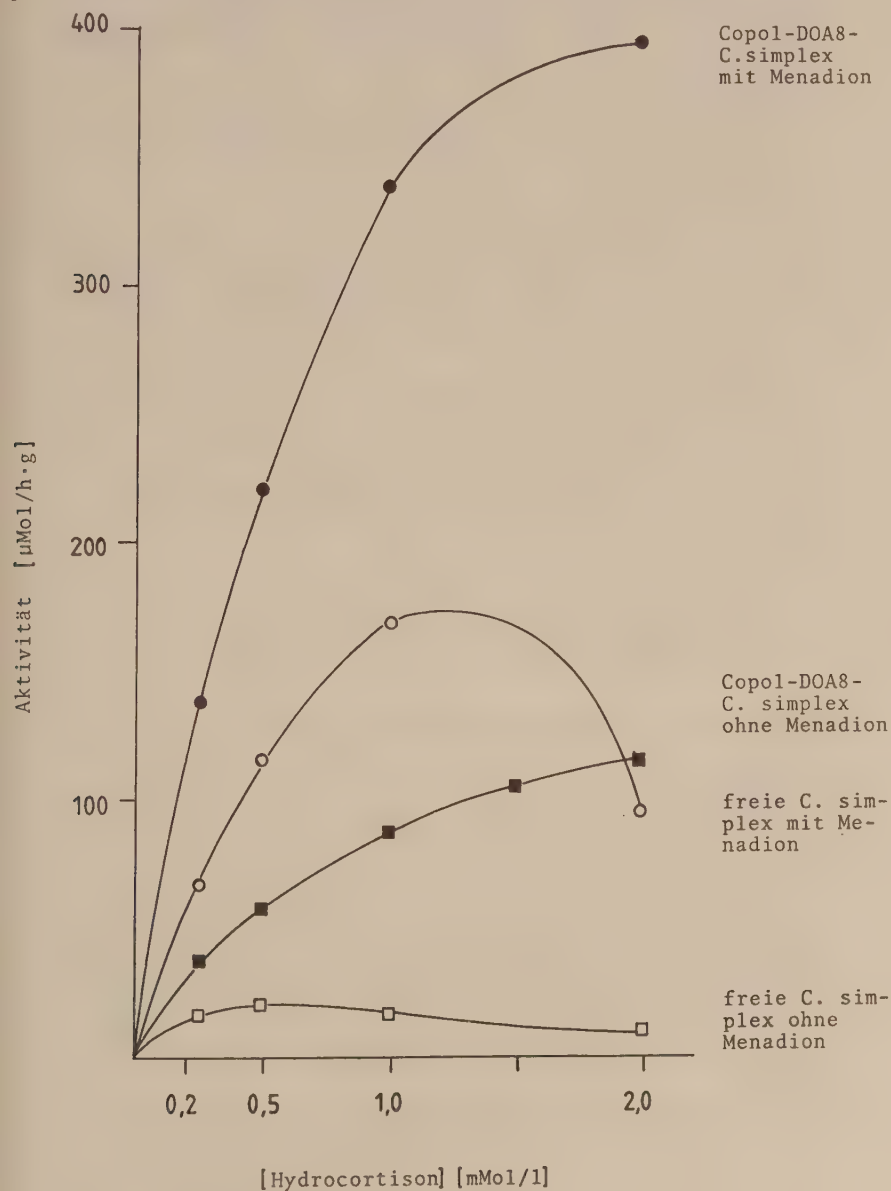
In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Menadion bei verschiedenen Substratkonzentrationen sowohl für ein Beispiel eines besonders aktiven Immobilisates als auch für native *C. simplex* Zellen untersucht. Dabei wurde die Menadionkonzentration so gewählt, daß sie jeweils die Hälfte der Hydrocortisonkonzentration betrug.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

Die Reaktionsbedingungen waren die gleichen wie auf Seite 52 beschrieben.

Abbildung 21

Abhängigkeit der Aktivität von freien immobilisierten C. simplex von der Substratkonzentration (mit und ohne Menadionzusatz)



Es treten folgende Besonderheiten auf:

1. Bei den Steroid-Umwandlungen ohne Menadion weisen die Aktivitäten sowohl der freien als auch der immobilisierten C. simplex bei 1,0 mMol/l Hydrocortison ein Maximum auf. Oberhalb dieser Konzentration scheint eine Substrathemmung vorzuliegen.

Dies stimmt mit den Untersuchungen von Rippe an nativem B. sphaericus (95), von Penasse et al. an nativem C. simplex (96) und Ohlson et al. (47) an immobilisierten C. simplex überein.

2. Bei den Steroid-Umwandlungen mit Menadion verlaufen die Aktivitätskurven nach der Michaelis-Menten-Kinetik ohne Hemmung. Dabei ist die Aktivität bei 1,0 mMol/l Hydrocortison um das Doppelte, bei 2,0 mMol/l um das Vierfache gesteigert worden.

Die gleiche Abhängigkeit der Aktivität von der Substratkonzentration wurde auch von Manecke und Beier (56, 57) bei den dort untersuchten Immobilisaten gefunden.

In der gleichen Weise verhielten sich auch die anderen, in dieser Arbeit beschriebenen Immobilisate.

3.1.4.5. Steigerung der Aktivität durch Enzyminduktion und Zellwachstum

Wie bekannt ist, kann das Enzym Steroid- Δ^1 -dehydrogenase in nativen C. simplex Zellen durch Inkubation mit Hydrocortison-Lösung induziert werden (24). Es findet eine Vermehrung des Enzyms in der Zelle statt, was zu einer Aktivitätserhöhung führt.

Die Enzyminduktion ist normalerweise linear abhängig vom Wachstum der Zellen, findet aber auch an nicht wachsenden Zellen - wenn auch geringer - statt. Ein Zusatz von Methanol oder DMF begünstigt die Enzymbildung. Das ist wahrscheinlich durch eine verbesserte Löslichkeit des Hydrocortison und einer damit verbundenen gesteigerten Aufnahme desselben durch die Zellen bedingt.

Auch bei immobilisierten Zellen führte die Inkubation mit

Hydrocortison-Lösung zu einer Steigerung der Aktivität (17, 56).

Weiterhin beobachteten Ohlsen et al. (49) ein mikrobielles Wachstum und damit verbunden eine Aktivierung der *C. simplex* Bakterien, die in Kalzium-Alginat-Gelen eingeschlossen waren, wenn die Immobilisate in einem Nährmedium inkubiert wurden. Die Autoren erzielten die besten Ergebnisse mit einer Mischung aus Phosphat-Puffer (0,1 M), Pepton (0,5 %), Glucose (0,2 %) sowie $MgCl_2$ und $CaCl_2$ (je 1 mM). Dadurch konnte die Aktivität der Immobilisate auf den sechsfachen Wert gesteigert werden.

Auch im Fall der in dieser Arbeit beschriebenen Immobilisate konnten die Enzyminduktion und die Aktivierung mit Nährlösung experimentell nachgewiesen werden, wobei je nach Art des einschließenden Mediums graduelle Unterschiede auftraten.

Die Effekte traten bei den in Poly(acrolein-co-NVP) eingeschlossenen *C. simplex* besonders deutlich auf. Daher sollen die Untersuchungen an diesen Immobilisaten an erster Stelle beschrieben werden, während erst danach auf die weniger aktiven PEI-Immobilisate eingegangen wird.

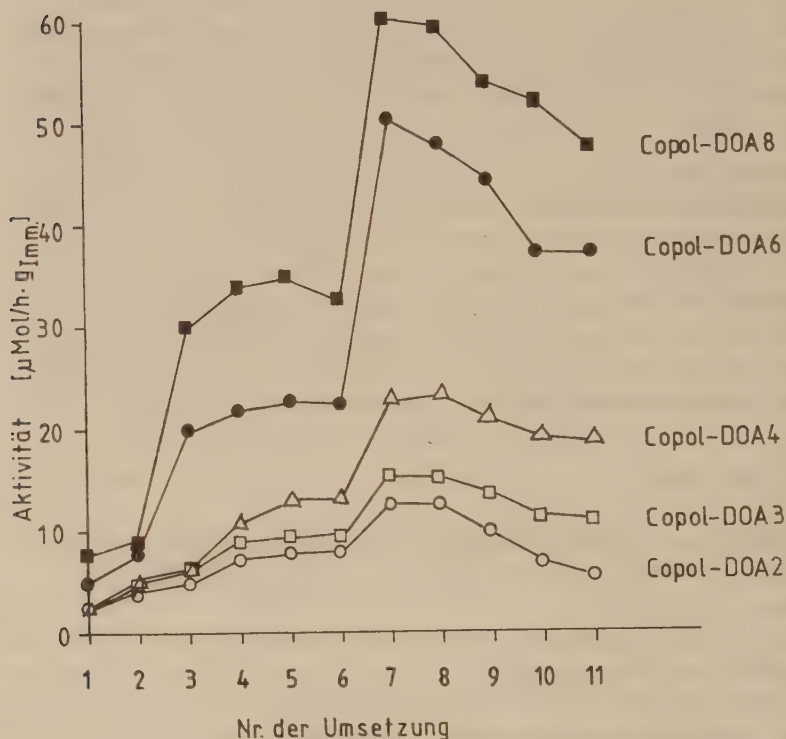
Die Abbildung 22 zeigt den Verlauf der Aktivität bei mehrfach wiederholten Umsetzungen mit jeweils frischen Hydrocortison-Lösungen von Immobilisaten, die unter Verwendung von Poly(acrolein-co-NVP) und Vernetzern der Gruppe A (Tabelle 2) hergestellt wurden.

Die Steroid-Umwandlungen wurden wie in Kapitel 3.4.1. (Seite 52) beschrieben, durchgeführt.

Jede Umsetzung dauerte bis zum vollständigen Verbrauch des Hydrocortisons. Danach wurden die Immobilisate durch ein Nylon-Sieb abgetrennt und mit neuer Substrat-Lösung versehen. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, stieg die Aktivität kontinuierlich, um nach fünf bis sechs Umsetzungen ein vorläufiges Maximum zu erreichen. Dieser Anstieg der Umwandlungsgeschwindigkeit wird auf eine Enzyminduktion zurückgeführt.

Abbildung 22

Abhängigkeit der Aktivität immobilisierter *C. simplex* von der Kettenlänge des Vernetzers bei mehrfach wiederholten Umsetzungen



Im Falle des DOA 8 als Vernetzer konnte die Aktivität dadurch auf das siebenfache der Anfangsaktivität gesteigert werden. Zwischen der sechsten und siebenten Umsetzung wurden die Immobilisate 24 h in einer Nährlösung, bestehend aus 50 ml Phosphat-Puffer, 1,0 mMol/l Hydrocortison, 0,5 % Pepton und 1 % DMF inkubiert.

Die Behandlung mit Nährlösung verdoppelte die Aktivität der Biokatalysatoren.

Es wurden auch andere Zusammensetzungen der Nährlösung auf ihre eventuelle aktivitätssteigernde Wirkung untersucht:

1. Eine von Ohlson et al. (49) vorgeschlagene Mischung aus 0,5 % Pepton und 0,2 % Glucose in Phosphat-Puffer und
2. eine Mischung aus 0,5 % Corn steep, 0,1 % Hefeextrakt und 0,05 % Stärkezucker (nach Mitteilungen der Schering AG Berlin).

In beiden Fällen konnte eine Verbesserung der aktivitätssteigernden Wirkung gegenüber der weiter oben beschriebenen Pepton-Nährlösung nicht festgestellt werden.

Außerdem zeigten die veränderten Nährmedien eine starke Neigung zur Kontamination mit Fremdkeimen, auch wenn der Luft-raum im Inkubationsschüttler mit UV-Licht entkeimt wurde.

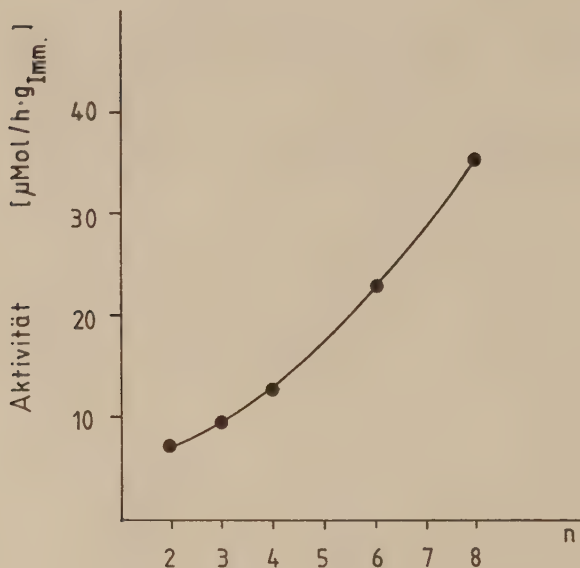
Bei der Verwendung von Pepton allein war eine Ansiedlung von Fremdkeimen auch bei unsteriler Arbeitsweise innerhalb von 24 h nur in seltenen Fällen zu beobachten.

Als ein weiteres Ergebnis dieser Untersuchungen wurde gefunden, daß die nach der Enzyminduktion erzielten katalytischen Aktivitäten abhängig waren von den Kettenlängen der Vernetzer. So wurden die höchsten Aktivitäten mit DOA 8 erzielt, während mit kürzerer Kettenlänge die Aktivität abnahm, wie in der Abbildung 23 dargestellt ist.

Eine Erklärung dafür wird in einem der nachfolgenden Kapitel zu geben versucht.

Abbildung 23

Abhängigkeit der Aktivität von der Kettenlänge des Vernetzers



Kettenlänge des Vernetzers $\text{H}_2\text{NO}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$

Es wurden die Aktivitäten bei der 5. Umsetzung (Abbildung 22) dargestellt.

Aktivitätssteigerungen durch Induktion und Zellwachstum wurden ebenfalls bei den in Poly(acrolein-co-NVP) eingeschlossenen *C. simplex* Zellen erzielt, wenn Vernetzer der Gruppe B (Tabelle 2) verwendet wurden. Hier waren jedoch die Unterschiede in der Aktivität bei verschiedenen Kettenlängen der Vernetzer nicht so signifikant.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 24 und 25 dargestellt.

Abbildung 24

Abhängigkeit der Aktivität immobilisierter *C. simplex* von der Kettenlänge des Vernetzers bei mehrfach wiederholten Umsetzungen

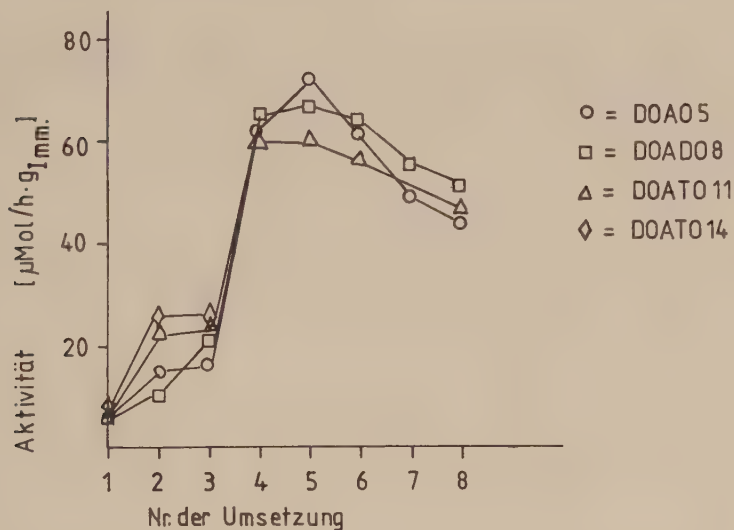
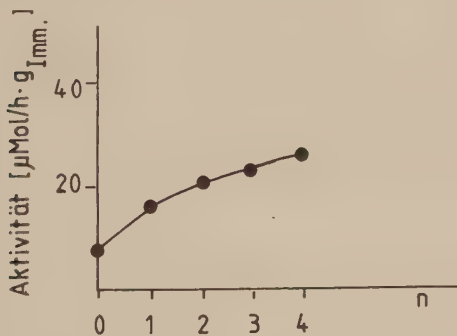


Abbildung 25

Abhängigkeit der Aktivität von der Kettenlänge des Vernetzers



n in der Formel $\text{H}_2\text{NO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{ONH}_2$

Es wurden die Aktivitäten bei der dritten Umsetzung (Abbildung 24) dargestellt.

Es scheint, daß die Aktivitätssteigerung durch die Enzyminduktion bereits nach drei Umsetzungen beendet war. Eine Aktivierung mit Nährlösung erfolgte nach der dritten Umsetzung.

Auch bei diesen Untersuchungen waren die Reaktionsbedingungen die gleichen wie bei den Immobilisaten, die durch Vernetzung mit Alkylendioxydamin hergestellt worden sind.

Die Verbindung mit $n = 0$ in der Abbildung 25 ist identisch mit Di(oxyamino)-ethan. Der mit diesem Vernetzer erzielte Aktivitätswert wurde der Abbildung 23 entnommen.

Wesentlich kleinere Aktivitäten traten auf, wenn C. simplex Zellen in PEI eingeschlossen wurden und zwar sowohl bei der Vernetzung mit Glutardialdehyd als auch mit Poly(acrolein).

Die Abbildungen 26 und 27 geben die mit diesen Systemen erzielten Resultate wieder.

Die Zellkonzentrationen der Immobilisate betrugen 50 %, wodurch zwar niedrigere Aktivitätsausbeuten erzielt wurden, der Effekt der Aktivierung aber besonders deutlich gemacht werden konnte.

Sowohl bei den mit GA als auch mit PA vernetzten Biokatalysatoren konnte nur eine geringe Aktivitätssteigerung durch eine Enzyminduktion beobachtet werden, während die Behandlung mit Nährlösung jedoch zu einer zwei- bis dreifachen Aktivitätssteigerung führte.

Die Aktivierung mit Nährlösung wurde wie eingangs in diesem Kapitel beschrieben, durchgeführt. Sie ist in den Abbildungen durch das Zeichen P angedeutet.

Signifikante Unterschiede konnten bei den verschiedenen vernetzten PEI-Immobilisaten nicht beobachtet werden.

Abbildung 26

Aktivität von PEI-GA-C. simplex bei wiederholten Umsetzungen

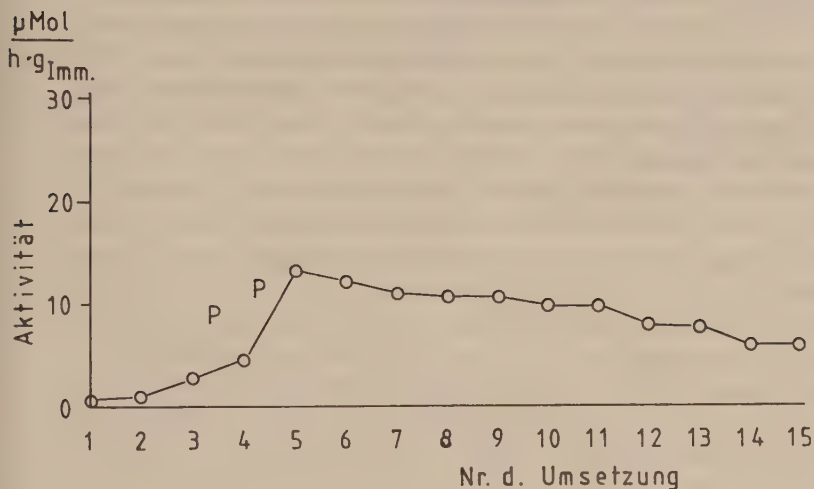
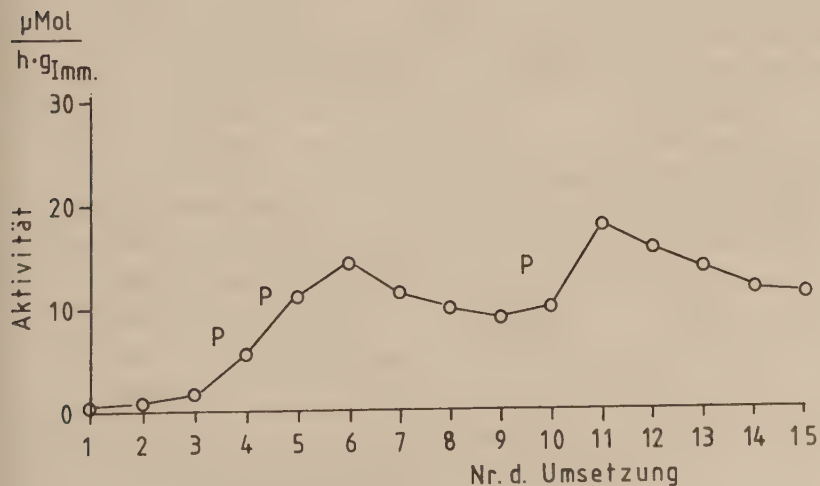


Abbildung 27

Aktivität von PEI-PA-C. simplex bei wiederholten Umsetzungen



3.1.4.6. Weitere Versuche zum Nachweis des Zellwachstums eingeschlossener C. simplex Zellen

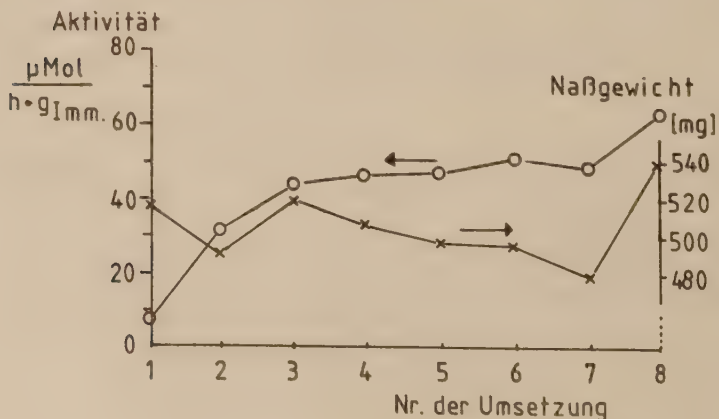
Um festzustellen, in welchem Maße die Aktivitätssteigerung der Copol-DOA8-C. simplex Immobilisate auf eine Enzyminduktion und wie weit auf ein Wachstum der eingeschlossenen Zellen zurückzuführen war, wurde bei mehrfach wiederholten Umsetzungen die Aktivität bestimmt und mit dem Gewicht der Immobilisate verglichen.

Zur Gewichtsbestimmung wurden die immobilisierten Zellen zunächst über einem Sieb mit 0,1 mm Maschenweite gewaschen und, wie in Kapitel 3.1.4.1. beschrieben, über einer Fritte abgesaugt.

Da eine derartige Gewichtsbestimmung infolge der schlechten Reproduzierbarkeit des Absaugeverfahrens ungenaue Werte lieferte, wurde die Messung an drei verschiedenen Proben der Immobilisate parallel durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Die Aktivitätsbestimmungen wurden mit 1,0 mMol/l Hydrocortison durchgeführt. Nach der siebenten Umsetzung wurde eine Aktivierung mit Nährlösung (wie oben beschrieben) unternommen. In Abbildung 28 sind die Aktivitäten und die Naßgewichte über der Nummer der Umsetzung aufgetragen.

Abbildung 28

Verlauf der Aktivität und des Naßgewichtes bei wiederholten Umsetzungen und der Einfluß von Nährlösung



Es zeigte sich, daß während der ersten sieben Umsetzungen die Aktivität ständig zunahm, während sich das Naßgewicht geringfügig verminderte. Diese Gewichtsverminderung war durch die Versuchsdurchführung und das damit verbundene ständige Umfüllen der Immobilisate begründet. Die Aktivitätszunahme könnte also vor allem durch eine Enzyminduktion erfolgt sein. Nach der Aktivierung mit Nährlösung wurden jedoch eine Gewichtszunahme von 60 mg und eine Aktivitätssteigerung von $18 \mu\text{Mol/h.g}_{\text{Imm}}$ gefunden, was hier vor allem auf ein Wachstum der eingeschlossenen Zellen zurückzuführen wäre.

Die Vermehrungsfähigkeit der eingeschlossenen Bakterien konnte auch in einer weiteren Untersuchung festgestellt werden. Dazu wurde ein Copol-DOA8-C. simplex Immobilisat mit einem niedrigen Zellgehalt von nur 19 % (w/w) hergestellt. Eine Probe davon wurde in zwei gleiche Teile geteilt. Eine Hälfte wurde lyophilisiert, um das Trockengewicht und damit auch die Menge der eingeschlossenen Zellen bestimmen zu können. Die zweite Hälfte wurde 24 h mit einer Nährlösung (0,5 % Pepton, 1 % DMF, 0,5 mMol/l Hydrocortison in 50 ml Phosphat-Puffer) inkubiert, danach sorgfältig über einem Nylon-Sieb mit 0,1 mm Maschenweite gewaschen und ebenfalls lyophilisiert.

Die Differenz der Trockengewichte von behandeltem und unbehandeltem Immobilisat sollte gleich der Masse der durch Vermehrung in der polymeren Matrix entstandenen Bakterien sein.

In einem Parallelversuch wurde eine gleiche Probe des Immobilisats wie oben beschrieben geteilt, wobei eine Hälfte unbehandelt blieb, die andere Hälfte ebenfalls mit Nährlösung inkubiert wurde. Von beiden Proben wurde die Aktivität bestimmt. Die Substratkonzentration betrug dabei 0,5 mMol/l Hydrocortison.

Die Ergebnisse der Gewichts- und Aktivitätsmessungen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3

Vermehrung von eingeschlossenen *C. simplex* durch Inkubation mit Nährlösung

	unbehandelt	inkubiert
Trockengewicht Immobilisat (mg)	135	174
Aktivität ($\mu\text{Mol/h.g}_{\text{Imm.}}$)	4	20

Der Gewichtsanteil der polymeren Matrix errechnet sich aus dem Zellgehalt des Immobilisates vor der Inkubation und beträgt 109 g. Da er während der Behandlung mit Nährlösung unverändert geblieben ist, ergeben sich für den Zellgehalt des Immobilisates und die Aktivität der eingeschlossenen Zellen folgende Werte:

	unbehandelt	inkubiert
Zellgehalt des Immobilisates (mg/g)*	190	370
Aktivität der eingeschlossenen <i>C. simplex</i> ($\mu\text{Mol/h.g}_{\text{Zellen}}$)	21	53
*mg pro g Trockenmasse des Immobilisates		

Es zeigte sich, daß die Menge der eingeschlossenen Bakterien durch die Behandlung mit der 0,5 %igen Peptonlösung um das 2,5fache gesteigert werden konnte.

Die beobachtete Steigerung der Aktivität der eingeschlossenen Zellen ist wahrscheinlich auf eine Enzyminduktion zurückzuführen, da die Nährlösung 0,5 mMol/l Hydrocortison enthielt.

3.1.4.7. Einfluß der Zellbeladung während der Einschließung von C. simplex auf die Aktivität der Immobilisate unter Berücksichtigung von Enzyminduktion und Zellwachstum

Nachdem gezeigt wurde, daß die in Poly(acrolein-co-NVP) immobilisierten C. simplex durch Induktion zu vermehrter Bildung der Steroid- Δ^1 -dehydrogenase und durch Inkubation mit Peptonlösung zur Vermehrung angeregt werden konnten, war zu untersuchen, ob die ursprünglich gewählte Zellbeladung von 50 % auch unter Berücksichtigung der oben erwähnten Effekte optimale Ergebnisse liefern würde.

Es wurden verschiedene Immobilisate von C. simplex mit Poly(acrolein-co-NVP) und DOA 8 als Vernetzer und Zellgehalten von 0,40 bis 0,55 g Zellen pro g Immobilisat hergestellt. Je 1 g (Naßgewicht) wurde in mehrfach wiederholten Umsetzungen mit 1,0 mMol/l Hydrocortison-Lösung zur Steroid-Umwandlung eingesetzt.

Zwischen der ersten und der zweiten Umsetzung wurden die Immobilisate zweimal je 24 h in 50 ml Phosphat-Puffer, 0,5 mMol/l Hydrocortison und 1 % DMF enthaltend, inkubiert.

Zwischen der zweiten und der dritten Umsetzung erfolgte eine Behandlung mit Nährlösung (50 ml Phosphat-Puffer, enthaltend 0,5 % Pepton, 0,5 mMol/l Hydrocortison und 1 % DMF).

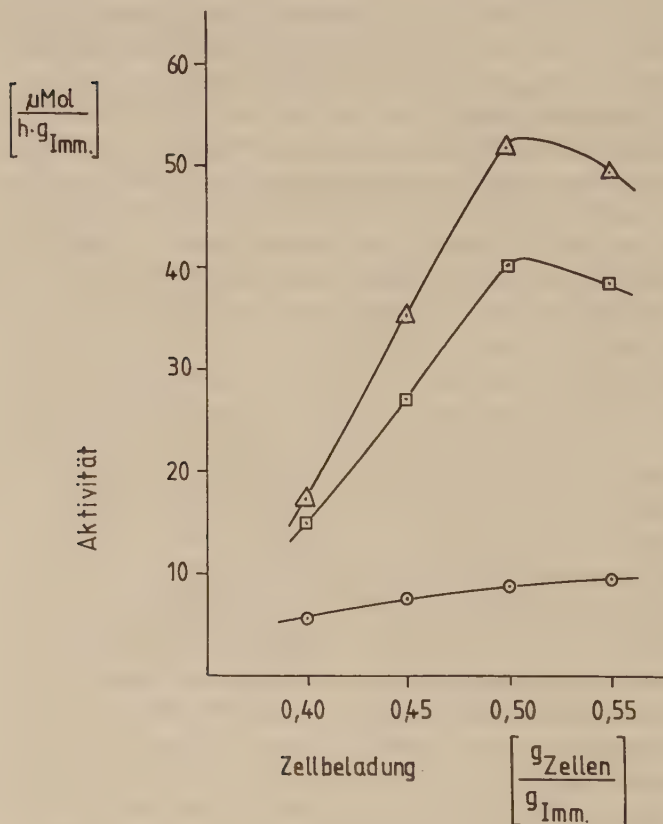
Die erzielten Aktivitäten sind in Abbildung 29 dargestellt.

Die Kurve der ersten Umsetzung zeigt den gleichen Verlauf wie die entsprechende Kurve in Abbildung 18 und steigt mit der Zellbehandlung an.

Nachdem Enzyminduktion und Zellbehandlung erfolgt sind, tritt jedoch ein Maximum der Aktivität bei einer Zellbeladung während der Einschließungsreaktion von 0,5 g Zellen pro g Immobilisat auf.

Abbildung 29

Der Einfluß der Zellbeladung während der Einschließungsreaktion auf die Aktivität der Immobilisate unter der Berücksichtigung von Enzyminduktion und Zellwachstum.



$\circ$ = Umsetzung nach der Immobilisierung

$\square$ = Umsetzung nach der Inkubation mit Hydrocortison

Δ = Umsetzung nach der Inkubation mit Pepton-Lösung

3.1.4.8. Abhängigkeit der Aktivität der Immobilisate von der Substratkonzentration

Wie bereits in Kapitel 3.1.4.4. erwähnt, findet bei Steroid-Umwandlungen mit *C. simplex* bei Hydrocortisonkonzentrationen größer als 1 mMol/l eine Substrathemmung statt, wenn die Reaktion ohne den Zusatz eines Cofaktors wie Menadion durchgeführt wurde.

Die Abhängigkeit der Aktivität von der Substratkonzentration wurde für zahlreiche *C. simplex* Immobilisate untersucht und mit den Eigenschaften der freien Zellen verglichen. Es wurden dabei Immobilisate verwendet, deren Aktivitäten durch vorangegangene Enzyminduktion und Aktivierung mit Nährlösung besonders hoch waren.

Die Steroid-Umwandlungen wurden mit je 1 g Naßgewicht der Immobilisate und 150 mg Trockengewicht der freien Zellen durchgeführt. Die Aktivitäten der Immobilisate wurden pro g eingeschlossener Zellen berechnet, wobei von der Anfangszellbeladung ausgegangen und eine eventuelle Vermehrung der Zellen in der polymeren Matrix nicht berücksichtigt wurde.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Abbildung 30 dargestellt.

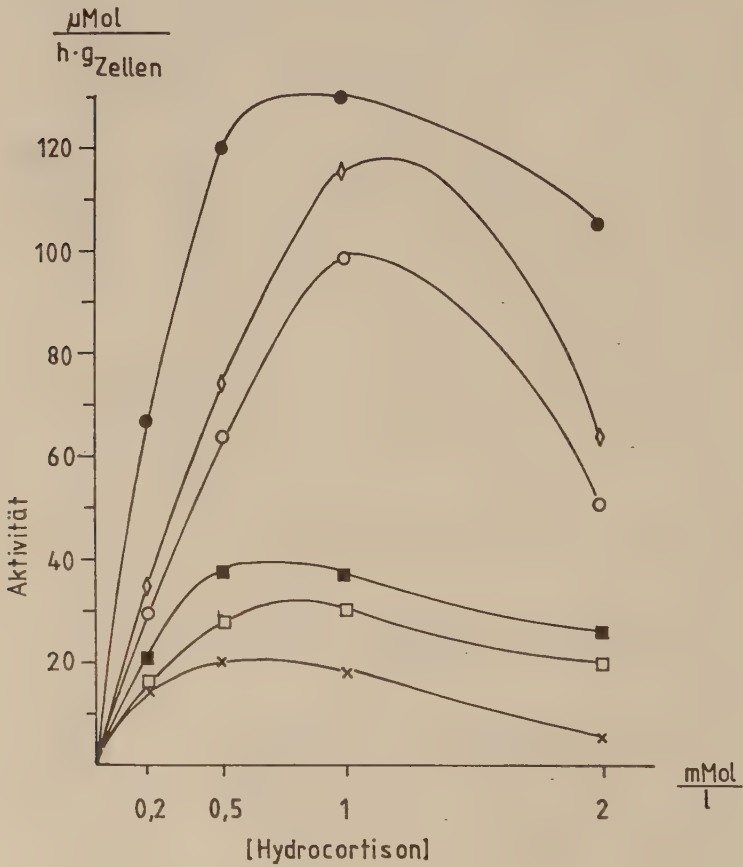
Sie zeigt deutlich den durch die Substrathemmung hervorgerufenen Aktivitätsabfall bei Hydrocortisonkonzentrationen größer als 1 mMol/l.

Jedoch waren die Substratkonzentrationen, bei denen die Aktivität den höchsten Wert hatte, nicht für alle Proben gleich. Besonders die Immobilisate Copol-DOA6-*C. simplex* und Copol-DOA8-*C. simplex* zeigten ein zu höheren Substratkonzentrationen hin verschobenes Maximum.

Als Grund für dieses Verhalten wird eine unterschiedliche Verteilung des Substrats zwischen der Lösung und der polymeren Matrix angenommen. Im Fall eines besonders hydrophoben Gels würde sich z. B. das eher lipophile Hydrocortison bevorzugt in dem Polymeren anreichern. Unter der Voraussetzung, daß das Volumen des Gels nicht zu klein gegenüber dem Volumen der Lösung ist, wird sich die Hydrocortisonkonzentration in der wässrigen Phase merkbar verringern.

Abbildung 30

Abhängigkeit der Aktivität immobilisierter und freier C. simplex von der Substratkonzentration (ohne Menadion-Zusatz)



- = DOADO8
- ◇ = DOA8
- = DOA6
- = PEI-GA
- = DOA3
- × = freie C. simplex

Da aber für die Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität der Zellen die Konzentration des Substrats in der Lösung maßgeblich ist, kann in diesem Fall die Hydrocortison-Einwaage höher sein, als es bei einem weniger hydrophoben Gel der Fall wäre.

Um die Richtigkeit dieser Vermutung zu überprüfen, wurden für die verschiedenen Immobilisate die Verteilungskoeffizienten des Hydrocortisons zwischen der flüssigen und der Gel-Phase bestimmt.

Nach Sonomoto et al. (52) kann der Verteilungskoeffizient P entsprechend der folgenden Gleichung 12 ermittelt werden:

$$P = \left(\frac{c_0 - c_1}{c_1} \right) \left(\frac{V_0}{V_1 - V_0} \right) \quad (12)$$

dabei bedeuten:

c_0 die ursprüngliche Hydrocortisonkonzentration in der Lösung

c_1 die Hydrocortisonkonzentration in der Lösung, nachdem das Gel zugefügt wurde

V_0 das Volumen der Lösung

V_1 das Volumen des Systems (Lösung + Gel)

Für die Untersuchungen wurde die übliche Substratkonzentration von 1,0 mMol/l in Phosphat-Puffer mit 1 % DMF gewählt. Die Substratlösung und die Immobilisate wurden in einem Volumenverhältnis von 10 : 1 zusammengegeben. Wegen $V_0 = 10 (V_1 - V_0)$ vereinfachte sich Gleichung 12 zu

$$P = 10 \left(\frac{c_0}{c_1} - 1 \right)$$

Um eine Umwandlung des eingesetzten Hydrocortisons zu verhindern, wurden die Immobilisate vorher durch kurzzeitiges Erwärmen auf 95 - 100° C deaktiviert.

Die Konzentrationsbestimmung des Hydrocortisons erfolgte nach dreistündigem Schütteln der Probe bei 30° C im Inkubationsschüttler.

Die erzielten Ergebnisse und die Verteilungskoeffizienten sind

in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Immobilisat	c_1 (mMol/l)	Verteilungskoeff.
PEI-GA	0,81	2,3
PEI-PA	0,83	2,0
Copol-DOAO5	0,76	5,2
Copol-DOATO11	0,71	7,1
Copol-DOA3	0,74	3,5
Copol-DOA4	0,60	6,7
Copol-DOA6	0,55	8,2
Copol-DOA8	0,50	10,0

Es zeigt sich, daß in den Gelen Copol-DOA6 und DOA8 eine größere Anreicherung des Hydrocortisons stattfand, als in den übrigen Polymeren. Erwartungsgemäß war bei diesen Immobilisaten das Konzentrationsoptimum der Aktivität zu höheren Substratkonzentrationen hin verschoben.

Wie Bhasin et al. (97) gezeigt haben, kann ein hydrophobes Gel bei der Steroid-Umwandlung als ein Steroid-Reservoir dienen. Dies bedeutet eine ebensolche Erhöhung der effektiven Substratkonzentration pro Reaktorvolumen, wie sie sonst durch den Zusatz organischer Lösungsmittel hervorgerufen wird, ohne wie die letzteren die enzymatische Stabilität der Mikroorganismen ungünstig zu beeinflussen.

Wurden die Steroid-Umwandlungen mit immobilisierten *C. simplex* in Gegenwart von Menadion durchgeführt, konnten wesentlich höhere Umwandlungsraten beobachtet werden.

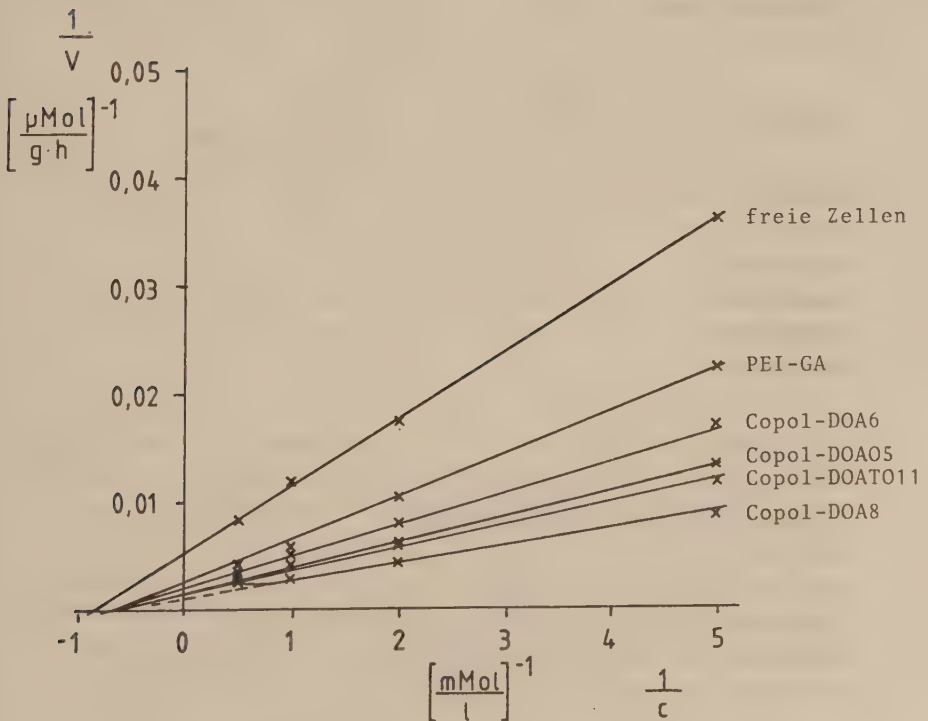
Wie schon in Kapitel 3.1.4.4. (Seite 59) erwähnt, bewirkte der Menadionzusatz jedoch eine Verminderung der Halbwertszeit der Aktivität bei mehrfach wiederholten Umsetzungen. Da aber bei der Reaktionsführung in Gegenwart des Cofaktors im allgemeinen keine Substrathemmung auftrat, wurde dieses System benutzt, um die kinetischen Parameter der Michaelis-Menten-Gleichung $K_M(\text{app})$ und V_{max} der einzelnen Immobilisate bestimmen zu können.

Dazu wurden, wie im vergangenen Kapitel beschrieben, die Steroid-Umwandlungen bei verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt, jedoch in Anwesenheit von Menadion. Die Einwaage an

Immobilisat betrug wieder je 1 g Naßgewicht, an freien Zellen 0,15 g Trockenpulver. Die Cofaktorkonzentration (Mol/l) betrug immer die Hälfte der Hydrocortisonkonzentration (Mol/l). Die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten V ließen sich in doppelt reziproker Darstellung gegenüber der Substratkonzentration c auftragen (Lineweaver-Burk-Darstellung), wobei für fast alle Immobilisate ein linearer Kurvenverlauf gefunden wurde (Abbildung 31).

Abbildung 31

Lineweaver-Burk-Darstellung für immobilisierte und freie C. simplex Zellen



Als einziges Immobilisat zeigte Copol-DOA8-C. simplex unterhalb von $1/c = 1 \text{ l/mMol}$ einen leichten nach oben gekrümmten Kurvenverlauf, was auf eine Substrathemmung hindeutete. Hier wurde der gerade Teil der Kurve durch eine gestrichelte Linie verlängert.

Aus den Steigungen und den Achsenabschnitten der einzelnen Geraden konnten die Konstanten $K_{M(\text{app})}$ und $V_{\text{max.}}$ der Michaelis-Menten-Gleichung berechnet werden.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4

Kinetische Konstanten $K_{M(\text{app})}$ und $V_{\text{max.}}$ verschiedener immobilisierter und freier C. simplex Zellen

Immobilisat	$K_{M(\text{app})}$ (mMol/l)	$V_{\text{max.}}$ ($\mu\text{Mol/h.g}_{\text{Zellen}}$)
(freie C. simplex)	1,1	180
PEI-GA	2,0	500
Copol-DOA6	1,2	454
Copol-DOA5	1,3	660
Copol-DOAT011	1,2	666
Copol-DOA8	1,3	769

Es zeigte sich, daß außer bei dem PEI-Immobilisat die $K_{M(\text{app})}$ -Werte nur wenig über dem der freien Zellen lagen, so daß eine Diffusionshemmung durch die polymere Matrix kaum eine Rolle zu spielen scheint.

Bei den letzten drei Immobilisaten in der Tabelle 4 scheint der hydrophobe Charakter der Gele - insbesondere beim Copol-DOA8 - eine günstige Auswirkung auf Reaktionsgeschwindigkeit und Stofftransport zu haben.

3.1.4.9. Steroid-Umwandlungen an festem Hydrocortison

Die Effektivität der fermentativen Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon mit *C. simplex* konnte enorm gesteigert werden, nachdem Kondo et al. (98) erkannt hatten, daß das Substrat in Mengen weit über die Löslichkeitsgrenze hinaus in mikrokristalliner Form in den Fermenter eingebracht werden konnte. Auf diese Weise wurde ein wesentlich höherer Steroid-Umsatz pro Reaktorvolumen ermöglicht.

Das Produkt Prednisolon wurde ebenfalls in Form feiner Kristalle gebildet. Dieses Verfahren der "Pseudocristallinofermentation" wurde auch mit immobilisierten *C. simplex* durchgeführt, und zwar von Ohlsen et al. mit in Kalzium-Alginat eingeschlossenen Zellen (49), von Constandinides mit in Collagen eingebetteten *C. simplex* (54) sowie von Manecke und Beier, die vernetzte Polyvinylalkohol-Derivate zum Einschluß von *C. simplex* verwendeten (99).

Auch die in der vorliegenden Arbeit hergestellten Immobilisate waren in der Lage, festes, mikrokristallines Hydrocortison in kristallines Prednisolon umzuwandeln, wobei teilweise hohe Aktivitäten erzielt wurden. Als ein Vorteil erwies es sich, daß während der Steroid-Umwandlung ganz auf die Anwesenheit organischer Lösungsmittel verzichtet werden konnte.

Die besten Ergebnisse wurden mit den Immobilisaten Copol-DOA8-*C. simplex*, Copol-DOA05-*C. simplex* und Copol-DOATO11-*C. simplex* (Tabelle 2, Seite 30) gefunden.

Die Pseudocristallinofermentation wurde folgendermaßen durchgeführt:

Zu etwa 2 g (Naßgewicht) des Biokatalysators in 50 ml Phosphat-Puffer wurden 180 mg mikronisiertes Hydrocortison gegeben. Die Reaktionsmischung wurde ebenso wie bei den anderen Steroid-Umwandlungen bei 30° C und 170 U/Min. in einem Inkubationsschüttler geschüttelt. Nach 24 h wurden die Immobilisate durch ein Nylon-Sieb mit 0,1 mm Maschenweite abgetrennt und mit Wasser nachgewaschen, bis das Volumen der Waschflüssigkeit insgesamt 250 ml betrug. In der Waschflüssigkeit lagen Prednisolon und eventuell nicht verbrauchtes Hydrocortison fein verteilt vor.

Ihre Mengen konnten quantitativ bestimmt werden.

Das Analyseverfahren wird im Kapitel "Experimenteller Teil" beschrieben.

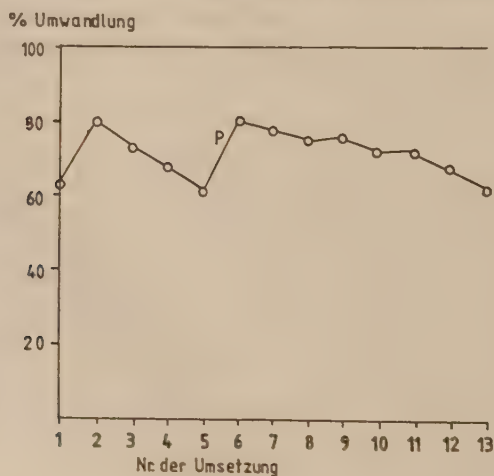
Es zeigte sich, daß die Immobilisate bei ihrem ersten Einsatz eine Gewichtszunahme von 20 - 30 mg pro g Biokatalysator erfuhren. Dies wird auf eine Anreicherung von Steroid in der polymeren Matrix zurückgeführt und hatte zur Folge, daß bei der ersten Steroid-Bestimmung nur etwa 60 % der Gesamtmenge gefunden wurden. Da sich die Menge des anhaftenden Steroids bei wiederholten Umsetzungen nicht veränderte, wurden die folgenden Steroid-Bestimmungen dadurch nicht beeinflusst.

In zahlreichen aufeinander folgenden Batch-Prozessen wurden die jeweils eingesetzten 180 mg Hydrocortison zu 60 - 80 % in kristallines Prednisolon umgewandelt, wobei jedoch bei dieser Verfahrensweise in den meisten Fällen noch ein Rest von 10 - 20 % unverändertem Hydrocortison verblieben.

Die mit den drei eingangs erwähnten Immobilisaten erzielten Umwandlungsraten bei mehrfach wiederholten Batch-Prozessen sind in den Abbildungen 32, 33 und 34 dargestellt.

Abbildung 32

Steroid-Umwandlung von festem Hydrocortison zu Prednisolon (Pseudocristallionfermentation) mit Copol-DOA8-C. simplex



P = Reaktivierung mit 0,5 % Pepton-Lösung

Abbildung 33

Steroid-Umwandlung von festem Hydrocortison zu Prednisolon
(Pseudocristallinofermentation) mit Copol-DOAO5-C. simplex

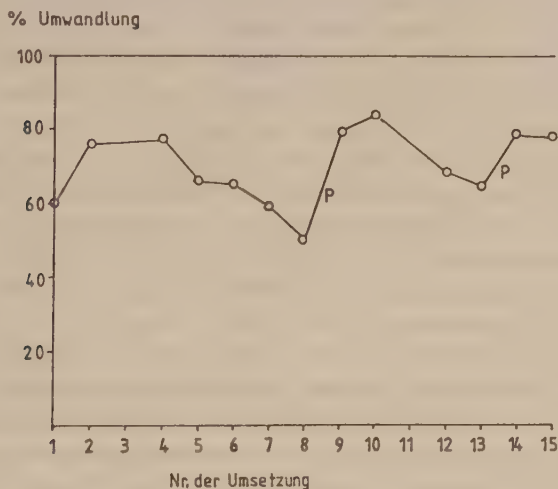
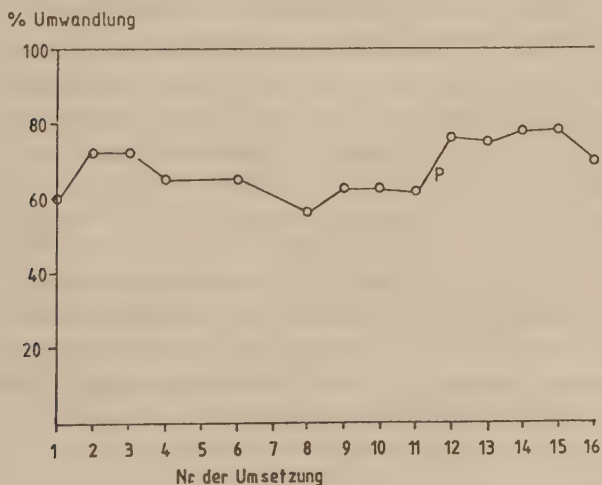


Abbildung 34

Steroid-Umwandlung von festem Hydrocortison zu Prednisolon
(Pseudocristallinofermentation) mit Copol-DOATO11-C. simplex



Man erkennt, daß die Aktivitäten der Immobilisate während der wiederholten Einsätze langsam abnahmen. Bei Copol-DOATO11-C. simplex z. B. betrug die Halbwertszeit 30 Umsetzungen bzw. 30 Tage. Nicht mehr so aktive Immobilisate konnten jedoch durch 48stündiges Behandeln mit einer Nährlösung, bestehend aus 50 ml Phosphat-Puffer mit 0,5 % Pepton reaktiviert werden. Die Inkubation mit Nährlösung wurde durch Schütteln bei 30° C durchgeführt. Nach den ersten 24 h wurden die Immobilisate durch ein Sieb abgetrennt und in frische Nährlösung gegeben. Vor dem nächsten Einsatz wurden sie sorgfältig mit Phosphat-Puffer gewaschen, um außerhalb der Gelpartikel gewachsene und anhaftende Bakterien zu entfernen.

Das bei den Steroid-Umwandlungen entstandene Produkt war weitgehend frei von Zellpartikeln.

Wie bereits erwähnt, enthielt das unter den hier beschriebenen Bedingungen hergestellte Produkt außer Prednisolon noch 10 - 20 % Hydrocortison. Die von anderen Autoren (49) geäußerte Vermutung, bei der Pseudocristallinofermentation würden die sich bildenden Prednisolon-Kristalle Hydrocortison einschließen, konnte nicht bestätigt werden.

Bei einer Verlängerung der Reaktionszeit auf 48 h wurden in einem Fall mit Copol-DOATO11-C. simplex 78 % der theoretischen Ausbeute an Prednisolon, aber kein Hydrocortison gefunden. In einem ähnlichen Versuch wurde mit Copol-DOAO5-C. simplex nach 48 h 68 % (der theoretischen Ausbeute) Prednisolon gefunden, ohne daß noch Hydrocortison nachgewiesen werden konnte.

Im allgemeinen war es schwierig, die Reaktion so zu führen, daß eine optimale Ausbeute an reinem Prednisolon erzielt werden konnte, da der hier verwendete C. simplex-Stamm das bereits gebildete Prednisolon häufig abbaute.

Abhilfe könnte hier die Verwendung eines leistungsfähigeren Stammes mit höherer Spezifität schaffen.

Aus den mit den einzelnen Immobilisaten erzielten durchschnittlichen Umwandlungsraten wurden die Aktivitäten der Biokatalysatoren berechnet. In diesem Fall wurden nicht die Anfangsaktivitäten ermittelt, sondern die Aktivitäten bis zum Erreichen einer ca. 80 %igen Umwandlung des jeweils einge-

setzten Hydrocortisons. Dazu wurden die Mengen umgewandelten Steroids durch die Zeit (24h) und durch die Mengen eingesetzter Biokatalysatoren dividiert. Es ergaben sich folgende Werte: $68 \mu\text{Mol/h.g}_{\text{Imm.}}$ für Copol-DOA8-C. simplex, $57 \mu\text{Mol/h.g}_{\text{Imm.}}$ für Copol-DOA05-C. simplex und $51 \mu\text{Mol/h.g}_{\text{Imm.}}$ für Copol-DOA011-C. simplex. Im günstigsten Fall (Copol-DOA8-C. simplex) entspricht dies pro g Immobilisat einer Produktion von 572 mg Prednisolon innerhalb von 24 h.

Es wird angenommen, daß die Unterschiede in der Aktivität der verschiedenen Biokatalysatoren in der mehr oder weniger hydrophoben Natur des einschließenden Gels zu suchen sind.

Auch hier hatte das Immobilisat mit dem größten Verteilungskoeffizienten für Hydrocortison die höchste Aktivität. Die Affinität des Trägerpolymeren zum Substrat scheint hier den Stofftransport besonders zu begünstigen.

Ein weiterer Grund für die allgemein hohe Aktivität bei der Umsetzung mit festem Substrat ist die Konzentration, die das in fester Form zugefügte Hydrocortison in der Lösung annimmt.

In einem zusätzlichen Experiment wurden 180 mg mikronisiertes Hydrocortison in 50 ml Phosphat-Puffer gegeben und wie bei den Steroid-Umwandlungen temperiert und geschüttelt. In Zeitabständen von fünf Minuten wurden Proben entnommen, filtriert und die Steroid-Konzentration in der wässrigen Phase bestimmt.

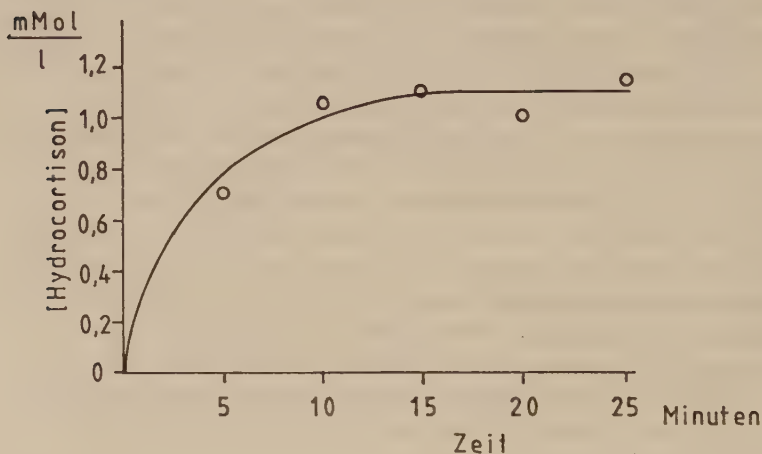
Wie die Abbildung 35 zeigt, wurde die Sättigungskonzentration von $1,1 \text{ mMol/l}$ bereits nach 15 Minuten erreicht.

Wie im vorigen Kapitel (3.4.1.8.) festgestellt wurde, liegt das Optimum der Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität für Copol-DOA8-C. simplex zwischen $1,1$ und $1,2 \text{ mMol/l}$ Hydrocortison. Dies deckt sich mit der Sättigungskonzentration des Hydrocortison.

Da außerdem der Übergang des Substrats von der mikrokristallinen Form in die wässrige Phase relativ schnell erfolgt, sind die günstigsten Voraussetzungen für eine hohe Effektivität des Biokatalysators gegeben.

Abbildung 35

Lösungskurve von mikronisiertem Hydrocortison in Phosphat-Puffer



Auch mit PEI-GA-C.simplex Immobilisaten ließen sich Pseudo-cristallinofermentationen durchführen, wenn auch die erzielten Ausbeuten bei weitem nicht so hoch waren wie bei den oben beschriebenen Immobilisaten.

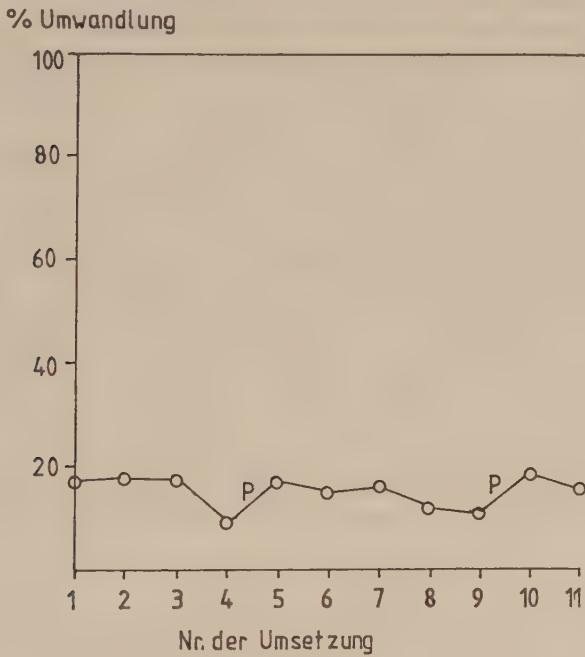
In Abbildung 36 sind die erzielten Ausbeuten bei wiederholten Umsetzungen mit demselben Immobilisat an je 180 mg mikronisiertem Hydrocortison dargestellt. Es wurden hier jedesmal ungefähr 16 % der eingesetzten 180 mg Hydrocortison zu Prednisolon umgewandelt, entsprechend einer Aktivität von 9 μMol pro h und g Immobilisat. Die Halbwertszeit der Aktivität betrug 7 Tage.

Auch durch eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 72 h war eine höhere Ausbeute als 50 % Prednisolon nicht zu erhalten, da infolge der geringeren Δ^1 -Dehydrogenase-Aktivität Abbaureaktionen stärker in Erscheinung traten.

PEI-Immobilisate sind daher für eine Umwandlung von festem Hydrocortison weniger gut geeignet.

Abbildung 36

Steroid-Umwandlung von festem Hydrocortison zu Prednisolon
(Pseudocristallinofermentation) mit PEI-GA-C. simplex



P = Reaktivierung mit 0,5 % Pepton-Lösung

3.1.4.10. Aktivitäten eingeschlossener B. sphaericus Zellen

Neben den C. simplex wurden auch Einschließungsversuche an B. sphaericus Trockenpulver unternommen. Die Steroid- 1-Dehydrogenaseaktivität war hier jedoch geringer. Während C. simplex Trockenpulver mit 1,0 mMol/l Hydrocortison-Lösung eine Aktivität von 20 μ Mol/h.g besaß, betrug die Aktivität von B. sphaericus Trockenpulver nur 8 μ Mol/h.g.

Erste Versuche der Einschließung in Copol-DOA8 führte zu Immobilisaten mit sehr geringen Aktivitäten. Bessere Ergebnisse konnten erzielt werden, wenn die B. sphaericus Zellen im nativen Zustand 24 h mit einer Nährlösung aus 0,5 % Pepton und 0,5 mMol/l Hydrocortison inkubiert wurden. Es konnte dann eine Zellmasse abzentrifugiert werden, die eine Δ 1-Dehydrogenase-Aktivität von 58 μ Mol/h.g_{Zellen} besaß. Diese frisch gezüchteten Bakterien wurden in Copol mit DOA8 als Vernetzer in der üblichen Weise (wie in Kapitel 3.1.2.5. beschrieben) eingeschlossen. Das Immobilisat mit einem Zellgehalt von 50 % wurde unter den gleichen Bedingungen wie die C. simplex-Immobilisate (Kapitel 3.1.4.5.) wiederholt zur Steroid-Umwandlung eingesetzt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt.

Es zeigte sich, daß die Aktivität des Immobilisates bei der ersten Umsetzung 17 Mol/h.g_{Imm.} betrug. Das entspricht einer Aktivitätsausbeute von 57 %.

Im Unterschied zu den C. simplex-Immobilisaten erfolgte bei den nächsten Umsetzungen keine Aktivitätssteigerung, sondern eine Abnahme. Durch eine 24stündige Inkubation mit Nährlösung (0,5 % Pepton, 0,5 mMol/l Hydrocortison) wurde im Verlauf der weiteren Umsetzungen das Immobilisat zweimal reaktiviert, wobei die Aktivität jedoch nicht über den bei der ersten Umsetzung erzielten Wert hinaus gesteigert werden konnte.

Die Halbwertszeit der Immobilisate betrug zwischen zwei Reaktivierungen vier Umsetzungen bzw. Tage.

Abbildung 37

Aktivität von Copol-DOA8-B. *sphaericus* bei wiederholten Umsetzungen



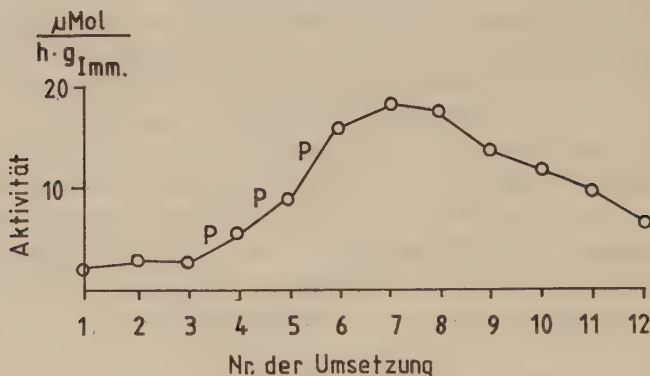
Die Immobilisierungsmöglichkeit von *B. sphaericus* in Copol wurde auch mit DOATO11 als Vernetzer untersucht. In diesem Fall wurde von dem weniger aktiven Bakterien-Trockenpulver ausgegangen und versucht, die zunächst geringe Aktivität der Immobilisate durch mehrfache Inkubation mit Nährlösung zu steigern.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Abbildung 38 dargestellt.

Der Zellgehalt bei der Immobilisierung betrug 50 %. Die Steroid-Umwandlung und die Aktivierung mit Nährlösung wurden wie mit den mit DOA8 vernetzten Immobilisaten durchgeführt.

Abbildung 38

Aktivität von Copol-DOAT011-B. sphaericus bei wiederholten Umsetzungen



Es zeigte sich, daß die Aktivität der Probe durch den Einfluß der Inkubation mit Nährlösung von Umsetzung zu Umsetzung gesteigert werden konnte, bis sie einen Wert erreichte, der auch unter Verwendung von frisch gezüchteten *B. sphaericus* und dem Vernetzer DOA8 erhalten wurde.

Es wird angenommen, daß die zunächst eingeschlossenen inaktiven Zellen durch Zell-Lysis langsam aus dem polymeren Netzwerk entfernt werden, und ihr Platz durch nachgewachsene aktive Zellen eingenommen wird.

Die Aktivität nahm nach Erreichen des Maximums (bei der 7. Umsetzung) mit einer Halbwertszeit von 4 Tagen ab.

Die Immobilisierung von *B. sphaericus*-Trockenpulver in PEI durch die Verwendung von GA oder PA als Vernetzer führte zu ähnlichen Ergebnissen. Auch hier besaßen die Immobilisate bei den ersten Umsetzungen eine geringe Aktivität. Wie in den Abbildungen 39 und 40 gezeigt, konnten die Aktivitäten durch eine mehrfach wiederholte Inkubation mit Nährlösung bis auf 15 $\mu\text{Mol/h.g. Imm.}$ gesteigert werden. Der Zellgehalt der Immobilisate betrug 60 %. Ihre Herstellungsmethode war die gleiche wie in Kapitel 3.1.1. (Seite 52) beschrieben. Die Akti-

vitätsbestimmungen und Aktivierungen mit Peptonlösung erfolgten in der gleichen Weise wie bei den *C. simplex* Immobilisaten in Kapitel 3.1.4.5. (Seite 52).

Die Halbwertszeiten nach Erreichen des Aktivitätsmaximums durch Pepton-Inkubation betrugen auch hier 4 Tage.

Abbildung 39

Aktivität von PEI-GA-B.sphaericus bei mehrfach wiederholten Umsetzungen

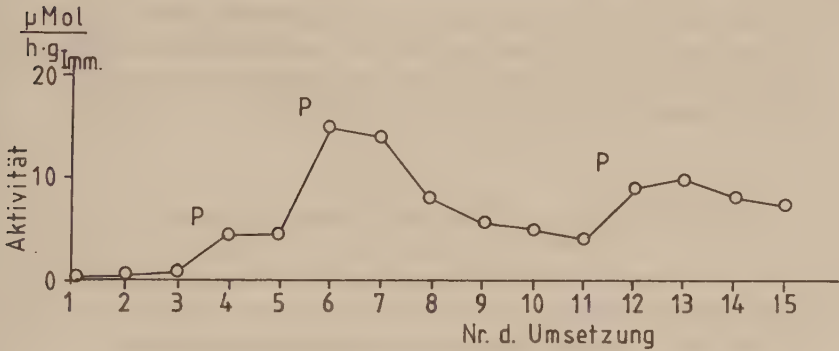
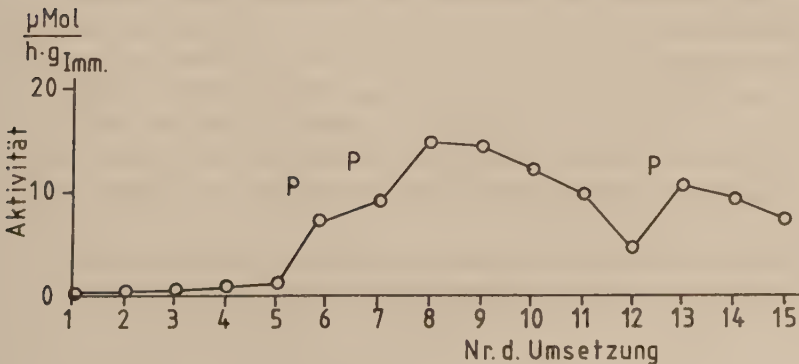


Abbildung 40

Aktivität von PEI-PA-B.sphaericus bei mehrfach wiederholten Umsetzungen



3.1.4.11. Langzeitstabilitäten der eingeschlossenen C. simplex und B. sphaericus Zellen

Bereits in Kapitel 3.1.4.3. (Seite 56) wurde festgestellt, daß eingeschlossene Bakterien durch den Immobilisierungsprozeß eine höhere Thermostabilität erhalten haben und ihre Aktivität durch pH-Wert-Änderungen weniger beeinflusst wird, als dies für die freien Zellen der Fall ist.

Es wurde erwartet, daß die Mikroorganismen durch die Einschließung in eine polymere Matrix auch eine gegenüber den freien Zellen erhöhte Langzeitstabilität ihrer $\Delta 1$ -Dehydrogenase-Aktivität besitzen. Daher wurden an einigen ausgewählten Immobilisaten sowohl die Stabilität der Aktivität unter Betriebsbedingungen als auch die Lagerstabilität untersucht.

3.1.4.11.1. Stabilität unter Betriebsbedingungen

Für eine hohe Standzeit von Bioreaktoren ist es wichtig, daß die eingesetzten Biokatalysatoren möglichst lange ihre Aktivität behalten. Als Maß für diese Stabilität der Aktivität unter Betriebsbedingungen dient ihre Halbwertszeit.

Ein weiterer, für die Anwendung in Bioreaktoren wichtiger Punkt, ist die Möglichkeit der Reaktivierung verbrauchter Biokatalysatoren.

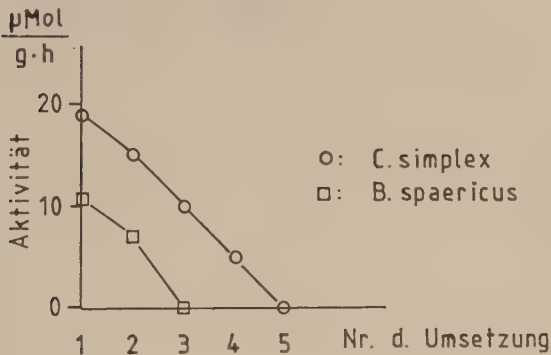
Beide Kriterien sind in den vorangegangenen Kapiteln bereits mehrfach angesprochen worden, sollen aber hier zusammengefaßt und durch die Ergebnisse weiterer vergleichender Untersuchungen ergänzt werden.

Zunächst wurde die Stabilität der Aktivität der verwendeten Bakterien-Trockenpulver untersucht. Dazu wurden 150 mg C. simplex und B. sphaericus mit 1,0 mMol/l Hydrocortison zur Steroid-Umwandlung eingesetzt. Die Zellen wurden nach 24 h abzentrifugiert und die Steroid-Umwandlung mit frischem Substrat wiederholt.

Wie Abbildung 41 zeigt, betrugen die Halbwertszeiten für C. simplex zwei Tage und für B. sphaericus nur einen Tag.

Abbildung 41

Aktivitäten nativer Bakterien bei mehrfach wiederholten Umsetzungen



Im Vergleich damit waren die Halbwertszeiten der Aktivitäten der immobilisierten Mikroorganismen größer.

Aus den Abbildungen 22, 24 und 26 wurden die Halbwertszeiten der Aktivitäten für den Umsatz mit einer Substratlösung aus 1,0 mMol/l Hydrocortison und 1 % DMF in Phosphat-Puffer entnommen. Als Anfangsaktivität wurde jeweils das Maximum nach erfolgter Aktivierung mit Nährlösung gewählt.

Die aus den Abbildungen ermittelten Halbwertszeiten sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die Tabelle enthält außerdem die Halbwertszeiten der Aktivität, die bei der Pseudocristallinofermentation (Abbildungen 32, 33, 34 und 35) festgestellt wurden, sowie die Halbwertszeiten der Aktivität der immobilisierten B. sphaericus Zellen.

Tabelle 5

Halbwertszeiten der Aktivität verschiedener Immobilisate

Immobilisat	Reaktions- bedingung*	Halbwerts- zeit (Tage)
PEI-GA-C. simplex	A	5
Copol-DOA2-C. simplex	A	4
Copol-DOA3-C. simplex	A	6
Copol-DOA4-C. simplex	A	7
Copol-DOA6-C. simplex	A	7
Copol-DOA8-C. simplex	A	8
Copol-DOA05-C. simplex	A	6
Copol-DOAT011-C. simplex	A	8
Copol-DOA8-B. sphaericus	A	4
Copol-DOAT011-B. sphaericus	A	4
PEI-GA-B. sphaericus	A	4
Copol-DOA8-C. simplex	B	35
Copol-DOA05-C. simplex	B	12
Copol-DOAT011-C. simplex	B	40
PEI-GA-C. simplex	B	7

* A 1,0 mMol/l Hydrocortison und 1 % DMF in 50 ml
Phosphat-Puffer, pH = 6,8

B 180 mg Hydrocortison (mikronisiert) in 50 ml
Phosphat-Puffer, pH = 6,8

Die höchste Aktivität wurde bei den Umsetzungen mit festem Substrat gefunden. Der Grund dafür ist wahrscheinlich in der völligen Abwesenheit von organischen Lösungsmitteln zu suchen.

Die Halbwertszeit betrug hier im günstigsten Fall 40 Tage. Bei der Steroid-Umwandlung an 0,1 mMol/l Hydrocortison und 1 % DMF in Phosphat-Puffer betrug die Halbwertszeit desselben Immobilisates nur acht Tage.

In einem Langzeitexperiment wurde ein Copol-DOA8-C. simplex Immobilisat in wiederholten Batch-Prozessen mit 0,5 mMol/l Hydrocortison und 1 % DMF in Phosphat-Puffer umgesetzt. Es sollte untersucht werden, ob eine Reaktivierung mit 0,5 % Pepton mehrfach durchgeführt werden konnte. Parallel dazu wurde die gleiche Probe mit 0,5 mMol/l Hydrocortison, 1 % DMF und 0,2 mMol/l Menadion umgesetzt.

Reaktivierungen mit Nährlösung wurden immer dann durchgeführt, wenn die Aktivität der Immobilisate ungefähr auf die Hälfte ihres Anfangswertes abgefallen war.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 42 dargestellt.

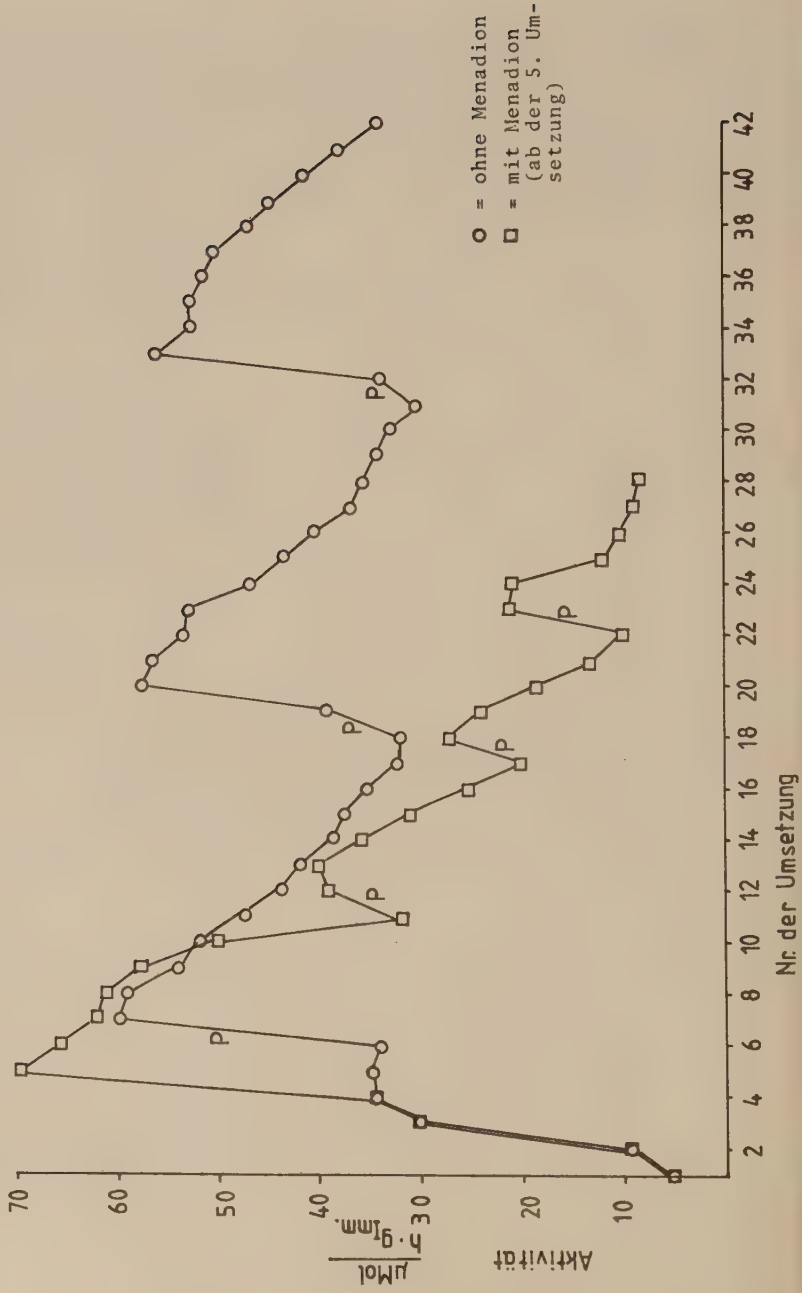
Bei der Reaktionsführung ohne Menadion wurde bei wiederholten Umsetzungen ein langsamer Abfall der Aktivität beobachtet. Die Inkubation mit Nährlösung führte jedoch mehrere Male zu einer vollständigen Reaktivierung der enzymatischen Wirksamkeit. Die Umsetzungen wurden nach dem 42. Mal abgebrochen, hätten aber theoretisch weitergeführt werden können, ohne daß der Biokatalysator unbrauchbar geworden wäre.

Bei der Reaktionsführung mit Menadion war zwar bei den ersten Umsetzungen eine höhere Umwandlungsgeschwindigkeit festzustellen, jedoch war der Abfall der Aktivität schneller, und eine Reaktivierung mit Nährlösung führte nicht mehr zur vollständigen Regenerierung der katalytischen Wirksamkeit.

Die bereits in Kapitel 3.1.4.4. (Seite 59) geäußerte Vermutung, Menadion schädige langfristig die enzymatische Aktivität der Zellen, konnte durch diesen Langzeitversuch bestätigt werden.

Abbildung 42

Aktivität von Copol-DOA8-C. simplex bei mehrfach wiederholten Umsetzungen mit und ohne Menadion



3.1.4.11.2. Lagerstabilität

Zur Bestimmung der Lagerstabilität wurden Immobilisate verwendet, deren Aktivität durch Enzyminduktion und Aktivierung mit Nährlösung optimiert war.

Die Biokatalysatoren wurden auf verschiedene Weise gelagert:

- a) gefroren bei -30°C
- b) unter Phosphat-Puffer bei $+ 5^{\circ}\text{C}$.

Nach Ablauf von einem, zwei und sechs Monaten wurde die Aktivität der Immobilisate wieder gemessen und mit ihrem ursprünglichen Wert verglichen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6

Lagerstabilitäten verschiedener Immobilisate

Immobilisat	Lagerung*	Aktivität** (%) nach Ablauf von		
		1 Monat	2 Monaten	6 Monaten
Copol-DOA8-C. simplex	-30°	100	100	100
	$+ 5^{\circ}$	95	90	80
Copol-DOA05-C. simplex	-30°	100	100	100
	$+ 5^{\circ}$	90	80	60
PEI-GA-C. simplex	-30°	100	100	100
	$+ 5^{\circ}$	80	75	40

* $- 30^{\circ}\text{C}$

$+ 5^{\circ}\text{C}$ unter Phosphat-Puffer

** Aktivität in % der ursprünglichen Aktivität

Substratlösung: 1,0 mMol/l Hydrocortison,
1 % DMF in Phosphat-Puffer

Es zeigte sich, daß die Immobilisate in gefrorenem Zustand bei $- 30^{\circ}\text{C}$ ohne Aktivitätsverlust gelagert werden konnten, während bei der Aufbewahrung unter Phosphat-Puffer im Kühlschrank innerhalb eines Monats ein geringer Aktivitätsverlust auftrat.

3.1.4.12. Abhängigkeit der Aktivität von der Korngröße der Immobilisate

Als letzte Untersuchung an den durch Einschluß immobilisierten Zellen sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Korngröße der Immobilisate einen Einfluß auf deren Aktivität hat.

Dazu wurden von den Immobilisaten Copol-DOA8-C. simplex und PEI-GA-C. simplex Siebfraktionen folgender Korngröße hergestellt:

- a) 100 - 125 μm
- b) 125 - 160 μm
- c) 160 - 200 μm
- d) 200 - 400 μm

Je 200 mg der verschiedenen Siebfraktionen wurden zur Steroid-Umwandlung an 1,0 mMol/l Hydrocortison und 1 % DMF in Phosphat-Puffer eingesetzt. Es stellte sich heraus, daß alle Siebfraktionen desselben Immobilisates die gleiche Aktivität besaßen. Demnach kann angenommen werden, daß an den in dieser Arbeit untersuchten Immobilisaten eine Diffusionshemmung nicht stattfindet.

3.2. Versuche zur covalenten Bindung von C. simplex an Synthesepulp SWP

Bei Synthesepulp SWP (synthetic wood pulp) handelt es sich um einen synthetischen Faserstoff, der ursprünglich von Crown-Zellerbach für die Papierherstellung entwickelt wurde (100). SWP ist eine Erscheinungsform des Polyethylens, die bei der sogenannten scherinduzierten Kristallisation von Polyethylen aus Polymerlösungen gebildet wird (101). Polyethylen kristallisiert dabei zu "Shish-Kebabs". Die Herstellung von SWP wird in Gegenwart von Polyvinylalkohol (PVA) als Hydrophilierungsmittel durchgeführt, wobei dieser fest an der Oberfläche der Fibrille fixiert wird (101).

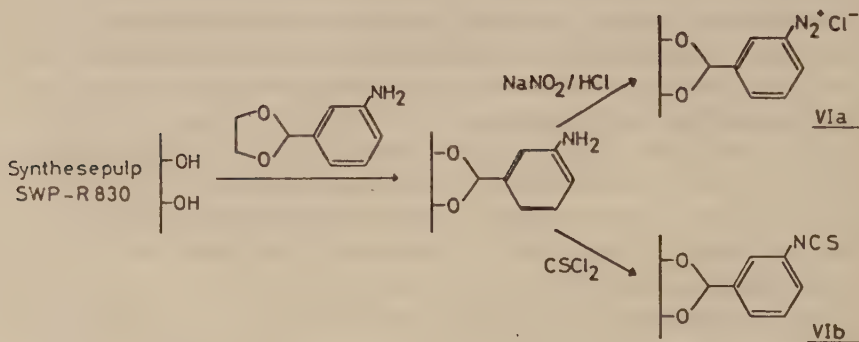
Derartige Polyethylenfibrille sind kommerziell z. B. als Hostapulp[®] (Hoechst) erhältlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde Synthesepulp der Firma Hoechst (Hostapulp) mit der Typenbezeichnung SWP-R 830 eingesetzt, dessen PVA-Gehalt bei 4,2 % lag. Der gleiche Faserstoff ist nach Derivatisierung mit 3-(3-Aminophenyl)-1,3-dioxolan und Einfügen reaktiver, zur Bindung von Proteinen geeigneter Gruppen in unserer Arbeitsgruppe bereits zur Immobilisierung von Enzymen eingesetzt worden (102, 103).

Um zu untersuchen, ob in ähnlicher Weise auch ganze Zellen covalent gebunden werden können, wurde gemäß dem in Abbildung 43 dargestellten Reaktionsschema Synthesepulp mit 2-(3-Aminophenyl)-1,3-dioxolan umgesetzt. Das Aminoderivat konnte durch Diazotierung in die entsprechende Diazoniumverbindung überführt werden (VIa), und durch Umsetzen mit Thiophosgen konnten Isothiocyanatgruppen eingeführt werden (VIb). Beide Träger besitzen ein ausgezeichnetes Bindungsvermögen für Proteine (102). VIa und VIb wurden mit einer Suspension von C. simplex Zellen in Phosphat-Puffer in Kontakt gebracht und über Nacht bei 5° C stehengelassen. Danach wurden nicht gebundene Zellen durch sorgfältiges Waschen über einem Sieb abgetrennt. Durch Abzentrifugieren der Zellen aus der Waschlösung und Auswiegen konnte festgestellt werden, daß Träger VIa 80 mg Zellen/g_{Imm.} und Träger VIb 160 mg/g_{Imm.} gebunden hatten.

Abbildung 43

Darstellung reaktiver Träger auf der Basis von Synthesepulp



Eine Blindprobe mit einem nicht aktivierten, noch die ursprünglichen Aminogruppen enthaltenden Synthesepulp-Derivat zeigte keine Aufnahme von Zellen. Da deshalb eine Adsorption ausgeschlossen werden kann, wird angenommen, daß tatsächlich eine covalente Bindung zwischen der polymeren Matrix und den Proteinen der Zelle vorliegt.

Die Immobilisate wurden zur Steroid-Umwandlung mit 0,5 mMol/l Hydrocortison-Lösung eingesetzt. Die Aktivitäten betrugen beim ersten Umsatz für die an VIa gebundenen Zellen 11 $\mu\text{Mol/h} \cdot \text{g}_{\text{Zellen}}$, was einer Aktivitätsausbeute von etwa 50 % entsprach. Bei wiederholten Umsetzungen fiel die Aktivität jeweils auf die Hälfte des vorangegangenen Wertes ab.

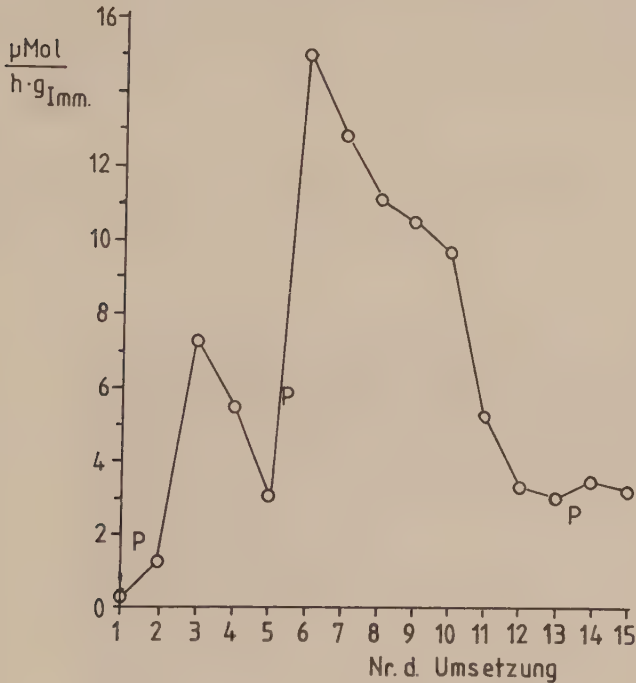
Im Falle der an VIb gebundenen Bakterien war die Aktivität beim ersten Umsatz mit 6 $\mu\text{Mol/h} \cdot \text{g}_{\text{Zellen}}$ niedriger. Es gelang aber, die Aktivität des Immobilisates durch Behandeln mit Nährlösung extrem zu steigern und dadurch mehrfache Umsetzungen zu ermöglichen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 dargestellt.

Die Aktivitäten sind in $\mu\text{Mol/h} \cdot \text{g}_{\text{Imm.}}$ angegeben, da über den Zellgehalt der Immobilisate infolge des möglichen Einflusses der Nährlösung keine genauen Aussagen gemacht werden können.

Abbildung 44

Aktivitätsverlauf von *C. simplex* Zellen, immobilisiert an NCS-Gruppen enthaltenden Synthesepulver bei wiederholten Umsetzungen



Reaktionsbedingungen:

357 mg Immobilisat mit 57 mg Zellgehalt in 50 ml Phosphat-Puffer, enthaltend 0,5 mMol/l Hydrocortison und 1 % DMF; bei 30° C und 160 U/Min. geschüttelt.

P bedeutet 48stündiges Behandeln mit Nährlösung (0,1 mMol/l Hydrocortison und 0,5 % Pepton in Phosphat-Puffer).

Die Aktivität fiel nach dem Erreichen eines Maximums mit einer Halbwertszeit von vier Tagen ab.

Nach der 13. Umsetzung war eine Reaktivierung durch Behandeln mit Nährlösung nicht mehr möglich.

Über die Natur der Vermehrung der covalent gebundenen Zellen können nur Vermutungen angestellt werden. So können zum Beispiel bei der Zellteilung Kolonien von zusammenhängenden Tochterzellen gebildet werden, die über die Mutterzelle noch an den Träger gebunden sind. In lichtmikroskopischen Aufnahmen von nativem *C. simplex* sind Agglomerationen von Bakterien häufig beobachtet worden.

Die Anwendung des durch covalente Bindung von *C. simplex* an Synthesepulp gebildeten Biokatalysators für die Steroid-Umwandlung ist begrenzt durch die relativ kurze Wirksamkeit, da im Gegensatz zu den durch Einschluß immobilisierten Zellen eine Reaktivierung mit Nährlösung nicht möglich ist. Es wäre aber denkbar, den reaktiven Synthesepulp zur Selektion von Zellen aus einem Gemisch heranzuziehen.

Da Zellen je nach Lebensalter in ihrer Membran in Art und Menge unterschiedliche Proteine besitzen, müßten sie auch unterschiedlich gut gebunden werden. Im günstigsten Fall wären dann nur Zellen der gleichen Generation am Träger immobilisiert.

Leider konnten aus Zeitgründen keine eingehenderen Untersuchungen an den covalent gebundenen *C. simplex* durchgeführt werden. Die wenigen hier dargestellten Ergebnisse mögen aber als Anreiz für weitere intensive Forschungen auf diesem Gebiet dienen.

3.3. Mikroskopische Aufnahmen von freien und immobilisierten C. simplex und B. sphaericus Zellen

Die folgenden Bilder wurden mit dem großen Forschungsmikroskop "Universal" von Zeiss und Kameraaufsatz aufgenommen. Es wurde im Durchlicht mikroskopiert. Die Präparate waren zuvor mit Safranin eingefärbt.

Abbildung 45:

freie C. simplex (Vergrößerung 1000fach)

Man erkennt die 1,5 μm bis 2 μm langen, an einem Ende etwas verdickten, stäbchenförmigen Bakterien. An manchen Stellen hängen zwei oder drei Zellen aneinander.

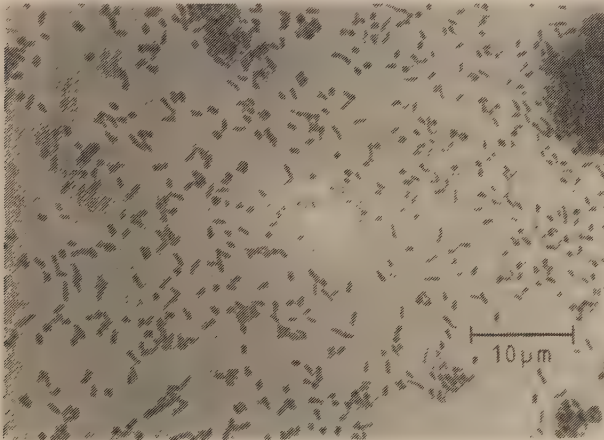


Abbildung 46:

freie *B. sphaericus* (Vergrößerung 400fach)

Die 4 μm bis 5 μm langen Bakterien sind ähnlich geformt wie die *C. simplex*, jedoch ohne die Verdickung an einem Ende.



Abbildung 47

Polymer-Zell-Konjugate (Copol-DOA4-*C. simplex*) bei geringer Vergrößerung (160fach). Man erkennt die unregelmäßige, zerklüftete Struktur der Gelpartikel.

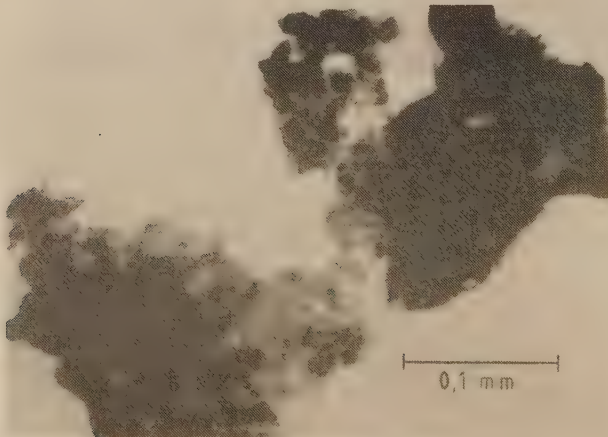


Abbildung 48: eingeschlossene *C. simplex* (Copol-DOAO5-C.simplex)
Vergrößerung 1000fach.

Die Gel-Partikel wurden etwas zerrieben, um die eingeschlossenen Bakterien, die sich als dunkle Schatten an den Rändern der Immobilisate abheben, besser sichtbar zu machen.

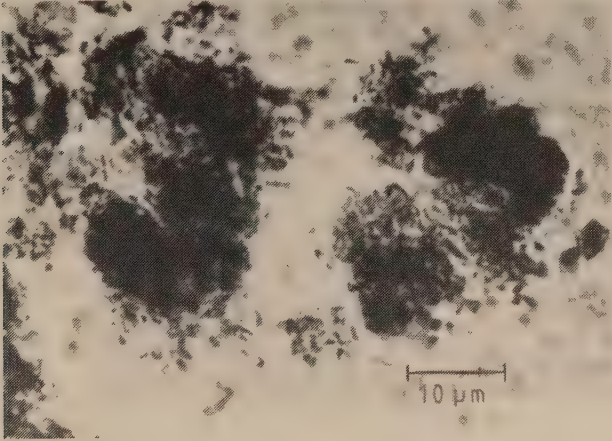


Abbildung 49: eingeschlossene *B. sphaericus* (Copol-PEI-GA-B. sphaericus), Vergrößerung 400fach.

Man erkennt auch hier die eingeschlossenen Bakterien, jedoch sind nur wenige in ihrer ursprünglichen Größe vorhanden (vergl. Abb. 46). Vielfach scheinen nur Zellfragmente vorzuliegen. Es sei daran erinnert, daß immobilisierte *B. sphaericus* vergleichsweise geringe $\Delta 1$ -Dehydrogenase-Aktivitäten aufwiesen. Der Grund mag sein, daß nur wenige der eingeschlossenen Zellen intakt geblieben sind.

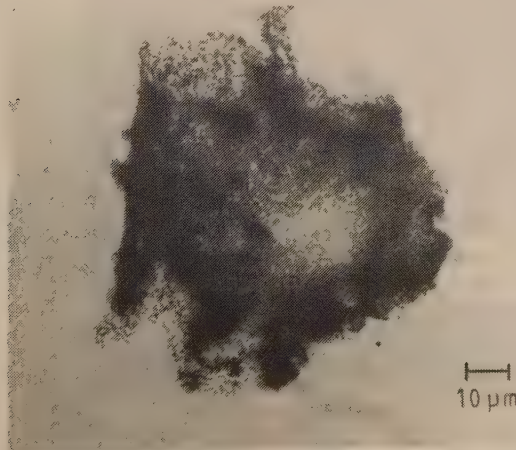


Abbildung 50

Faser des Synthese-Pulps in 1000facher Vergrößerung ohne immobilisierte Zellen.

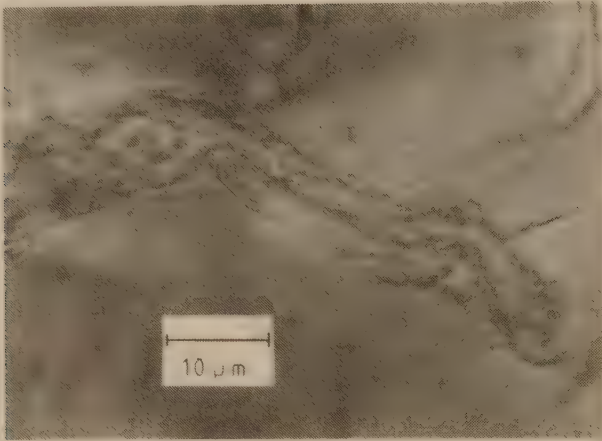
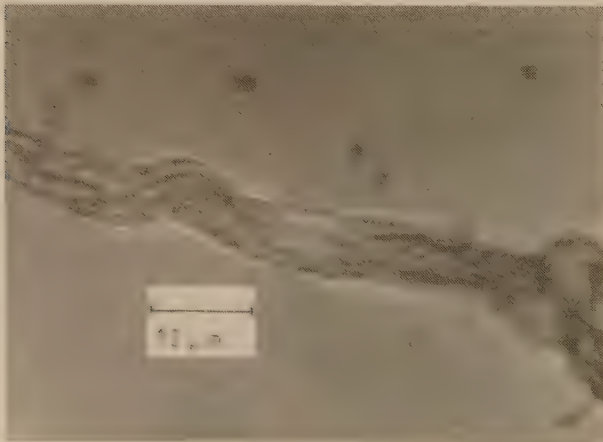


Abbildung 51

wie Abb. 50, jedoch nach der Bindung von *C. simplex*.
Man erkennt längs zur Faser liegende, stäbchenförmige Gebilde, die in Form und Größe mit freien *C. simplex* übereinstimmen.



4. EXPERIMENTELLER TEIL

4.1. Allgemeine Hinweise

Die Elementaranalysen wurden im Mikrolabor des Institutes für Organische Chemie an der Freien Universität Berlin angefertigt.

Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert und wurden an einem Kofler-Heiztisch bestimmt.

Die IR-Spektren wurden als KBr-Preßling mit einem Perkin-Elmer-Spektralphotometer 580 B aufgenommen.

Die Aufnahmen der NMR-Spektren erfolgte mit den Spektrometern Varian XL 100 und Bruker WH-270 mit TMS als innerem Standard.

Die Differential-Puls-Polarogramme wurden mit dem Gerät Polarecord E 505 und Meßplatz E 506 erstellt.

Für die HPLC-Trennungen wurde der Chromatograph Series 3 (Perkin Elmer), die Säule Li-chro sorb Diol 5 μ (Merck), der UV-Detektor L 15 (Perkin Elmer) und der Integrator Sigma 10 (Perkin Elmer) verwendet.

UV-spektroskopische Steroid-Bestimmungen erfolgten mit dem Spektralphotometer 555 von Perkin Elmer.

Für Siebungen stand eine elektromagnetische Siebmaschine Analysette (Fritsch) zur Verfügung.

Zum Glattrühren von Zellsuspensionen wurde der Rührer Ultra-Turrax (Janke & Kunkel) eingesetzt.

Dialysen wurden in Visking-Dialysierschläuchen der Fa. Serva durchgeführt.

Der Wasserbad-Rundschüttler WTR-1 und der Inkubationsschüttler Lab-Therm stammten von Braun, Melsungen.

Die verwendeten Mikroorganismen *C. simplex* und *B. sphaericus* sowie Hydrocortison, Prednisolon, Cornsteep, Hefeextrakt und Stärkezucker wurden freundlicherweise von der Schering AG Berlin zur Verfügung gestellt.

Polyethylenimin (Äthyleniminpolymer) und N-vinyl-2-pyrrolidon waren Produkte der Fa. Fluka.

Alle anderen Chemikalien wurden von der Fa. Merck bezogen.

Synthesepulp SWP[®]-R 830 wurde von Hoechst-Zellerbach erhalten.

4.2. Meßmethoden und präparative Vorschriften

Zu 3.1.1.

Reinigung von Polyethylenimin (PEI)

50 g PEI (50 %ige Lösung in Wasser) wurde mit Wasser auf etwa 200 ml aufgeführt und mit konz. HCl versetzt, bis der pH-Wert der Lösung 8,0 erreichte (Verbrauch etwa 22 ml).

Anschließend wurde die Lösung zwei Tage gegen dest. Wasser dialysiert, wobei sich der pH-Wert auf 7,6 veränderte.

Nachdem die Hauptmenge des Wassers am Rotationsverdampfer abgezogen war, wurde der Rückstand lyophilisiert. Es verblieben 17,9 g Polyethylenimin-hydrochlorid als farblose, spröde und hygroskopische Masse.

Der Stickstoffgehalt wurde zu 22,69 % bestimmt. Daraus ließ sich ein Gehalt von 0,70 g PEI/g_{Substanz} berechnen. Aus dem Stickstoffgehalt ließ sich weiterhin errechnen, daß 69 % der N-Atome im PEI protoniert waren.

Die 17,9 g PEI-hydrochlorid wurden in 125 ml Wasser gelöst, um eine 10 %ige (w/w) Lösung (bezogen auf PEI) herzustellen.

Zu 3.1.1.1.

Einschließung von Zellen in PEI durch Vernetzung mit Glutaraldehyd (Standardvorschrift)

10 ml eiskalte PEI-Lösung (hergestellt wie oben beschrieben) wurde mit 1 bis 3 g (je nach gewünschtem Zellgehalt) Bakterien-Trockenpulver gemischt und mit einem Hochgeschwindigkeitsrührer 10 sec glattgerührt. Die Bakteriensuspension wurde weiter in Eiswasser gekühlt und unter starkem Rühren (Magnetrührer) mit 2,5 bis 4,6 ml (je nach gewünschtem Vernetzungsgrad) einer 25 %igen (w/w) handelsüblichen und eiskalten wässrigen Glutaraldehydlösung versetzt.

Das Reaktionsgemisch verfestigte sich innerhalb von Sekunden zu einem Gel. Seine zuerst hellbraune Farbe vertiefte sich beim Stehenlassen immer mehr und der Geruch nach Glutaraldehyd verschwand allmählich.

Nach fünfminütigem Stehen wurde das Gel mit einem Spatel grob zerkleinert und unter leichtem Rühren mit einem Magnetrührer 20 Minuten in 250 ml Phosphat-Puffer (0,025 Mol/l Na_2HPO_4 und 0,025 Mol/l KH_2PO_4 , pH = 6,8) gewaschen.

Danach hatte sich die Waschflüssigkeit durch ausgewaschene Bakterien mehr oder minder (je nach Zellangebot) getrübt. Der Ansatz wurde fünf Minuten stehengelassen. Währenddessen setzten sich die Immobilisat-Partikel am Boden ab. Einige ml der überstehenden Suspension der freien Zellen wurden aufgehoben, um durch Messung der optischen Dichte die Menge an ausgewaschenen Zellen bestimmen zu können. Die Immobilisate wurden gleich anschließend naß gesiebt.

Zu 3.1.1.1.

Siebung der Immobilisate

Zur Naß-Siebung der Polymer-Zell-Konjugate wurde eine elektromagnetische Siebmaschine (Analysette[®], Fa. Fritsch) verwendet. Sie enthielt drei Prüfsiebe (100 mm Ø) mit folgenden Maschenweiten: 1) 0,1 mm, 2) 0,2 mm und 3) 0,5 mm.

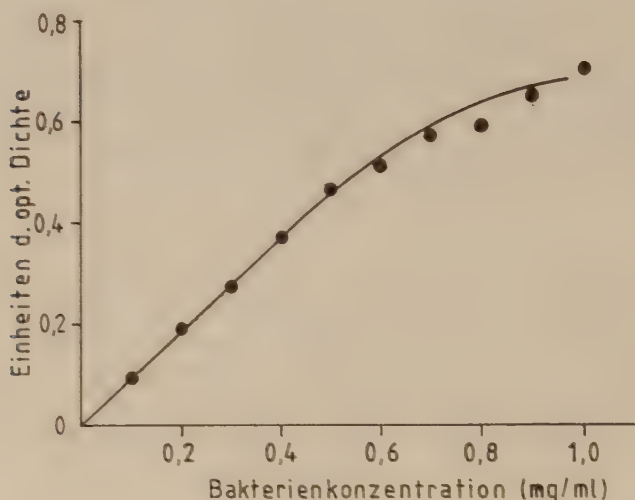
Die Siebe waren zwischen einer Siebpfanne mit Ablauf und einem Siebkopf mit Sprühdüse und Wasseranschluß eingespannt, so daß die Siebung unter fließendem Leitungswasser erfolgen konnte. Die Fraktionen der Immobilisate von 0,1 - 0,2 mm und 0,2 - 0,5 mm Durchmesser wurden auf einer Glasfritte (GO) gesammelt und 30 sec mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die so erhaltenen feuchten Biokatalysatoren konnten bei -30° C aufbewahrt werden.

Zu 3.1.1.1.

Bestimmung der Menge ausgewaschener Zellen

In einer 1 cm Küvette eines Filter-Photometers (LP 5, Dr. Lange) bei der Wellenlänge 546 nm wurde die optische Dichte der Waschflüssigkeit mit den darin suspendierten freien Zellen bestimmt. Zuvor war unter Verwendung von Standardsuspensionen bekannten Gehaltes eine Eichkurve erstellt worden. Die Standards wurden hergestellt, indem 1 ml einer frisch hergestellten Suspension von 100 mg C. simplex Trockenpulver in 10 ml Phosphat-Puffer mit weiterem Puffer auf 100 ml bis 1000 ml aufgefüllt wurde.

Eichkurve zur Bestimmung der Menge frei suspendierter *C. simplex* in der Waschlösung



Zu 3.1.1.2.

Darstellung von Polyacrolein

Polyacrolein wurde nach der Methode von Schulz und Cherdron (65) durch Redoxpolymerisation von 100 ml Acrolein mit Kaliumperoxydisulfat und Silbernitrat als Initiator als farbloses, unlösliches Pulver hergestellt.

Es wurden 73,1 g Polyacrolein erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 87 % der Theorie.

Zu 3.1.1.2.

Darstellung der Polyacrolein-Bisulfitadditionsverbindung

Es wurde analog der von Pohl (104) angegebenen Vorschrift verfahren: 22,4 g Polyacrolein wurde in eine Lösung von 38 g Natriumbisulfit und 500 ml Wasser gegeben. Nach fünftägigem Rühren hatte sich das Polymere gelöst. Es wurde von etwas schwarzem Rückstand abfiltriert und die Lösung drei Tage gegen dest. Wasser dialysiert. Danach wurde das Lösungsmittel am Rotati-

onsverdampfer abgezogen und der Rückstand im Vakuumexsiccator über P_4O_{10} getrocknet.

Die Ausbeute betrug 23,4 g einer farblosen und spröden Masse.

Zu 3.1.1.2.

Bestimmung des Aldehydgruppengehaltes von Polyacrolein und der Polyacrolein-Bisulfitadditionsverbindung

Die Bestimmung erfolgte analog der Methode, wie sie im Organikum (69) für niedermolekulare Aldehyde beschrieben wird.

Es wurde zunächst eine Reagenzlösung aus 17,5 g Hydroxylaminhydrochlorid, 200 ml n-Propanol und 50 ml Wasser hergestellt.

Die Lösung wurde mit 20 %iger wässriger Kalilauge auf pH = 4,00 eingestellt.

Zur Analyse wurden in einem luftdicht verschließbaren, mit einer pH-Elektrode versehenen Titrationsgefäß 1,24 g Polyacrolein mit 50 ml Reagenzlösung versetzt und die frei werdende Salzsäure mit 1 N Natronlauge bis pH = 4,0 titriert. Nach einer Stunde war die Reaktion beendet, und der Verbrauch an Natronlauge betrug 16,0 ml.

Das entspricht einem Aldehydgruppengehalt von 12,9 mMol/g.

Der theoretische Gehalt an Aldehydgruppen wurde mit 17,5 mMol/g berechnet. Demnach lag das Polymere zu 77 % als Polyaldehyd vor.

Die gleiche Bestimmung wurde mit 1,48 g der Polyacrolein-Bisulfitadditionsverbindung durchgeführt. Hier betrug der Verbrauch an 1 N Natronlauge 11,4 ml. Das entspricht einem Aldehydgruppengehalt von 7,7 mMol/g.

Zu 3.1.1.2.

Einschließung von Bakterien durch Vernetzung von PEI mit Polyacrolein-Bisulfitadditionsverbindung (PA) (Standardvorschrift)

Die Vernetzungsreaktion wurde in der gleichen Weise durchgeführt, wie sie oben für Glutaraldehyd beschrieben worden ist. PA wurde als 22 %ige wässrige Lösung eingesetzt. Die zugegebene Menge PA-Lösung variierte je nach gewünschtem Vernetzungsgrad von 5,5 ml bis 11 ml. Es bildeten sich in etwas langsamerer Reaktion als beim Glutaraldehyd Klumpen von ausgefallenen Polymer-

Zell-Konjugaten, die sich innerhalb von wenigen Minuten verfestigten. Ihre Farbe vertiefte sich zu rostbraun. Sie wurden nach 20minütigem Stehenlassen wie oben beschrieben in 250 ml Phosphat-Puffer gewaschen. Auch die Bestimmung der freien Zellen in der Waschlösung erfolgte in analoger Weise.

Zu 3.1.1.3.

Optimierung der Immobilisierungsreaktion durch Variation der Vernetzermenge

Die Reaktionen wurden entsprechend den Standardvorschriften und mit *C. simplex* durchgeführt. Als Zellgehalt wurden 50 % (w/w) angestrebt.

Die folgenden beiden Tabellen enthalten die Reaktionsansätze für die Vernetzung mit Glutaraldehyd GA (Tabelle 7) und mit Polyacrolein-Bisulfitadditionsverbindung (Tabelle 8).

Die Aktivitäten wurden wie in Kapitel 3.1.4. beschrieben, bestimmt.

Tabelle 7 Vernetzung mit GA

Nr.	mMol	PEI ml	Lsg.*	GA mMol	ml	Lsg.**	C. simplex		Ausbeuten (Naßgewicht)		Aktivitäts- ausbeute (%)***
							angeboten	ausgewa- schen (mg)	(g) Siebfractionen 0,1-0,2mm	(g) Siebfractionen 0,2-0,5mm	
1	23	10		11,5	4,64		1,74	5	0,7	4,5	45,3
2	23	10		9,3	3,72		1,59	4	1,3	3,9	54,6
3	23	10		7,0	2,80		1,45	6	0,2	4,9	32,8
4	23	10		4,6	1,84		1,30	20	0,3	4,8	10,9

* 10 % w/w (bezogen auf PEI)
 ** 25 % w/w
 *** Substratlösung: 0,5 mMol/l Hydrocortison, 0,2 mMol/l Menadion in 50 ml Phosphat-Puffer, pH=6,8 (30° C)

Tabelle 8 Vernetzung mit PA

Nr.	mMol	PEI ml	Lsg.*	PA mMol**ml	Lsg.***	C. simplex		Ausbeuten (Naßgewicht)		Aktivitäts- ausbeute (%)****
						angeboten	ausgewa- schen (mg)	(g) Siebfractionen 0,1-0,2mm	(g) Siebfractionen 0,2-0,5mm	
1	23	10		23,0	13,64	3,60	60	0,3	7,8	26,9
2	23	10		18,4	10,90	3,08	150	0,5	9,2	30,4
3	23	10		13,8	8,18	2,56	112	0,3	6,6	34,5
4	23	10		9,2	5,45	2,04	200	1,1	5,9	27,9

* 10 % w/w (bezogen auf PEI)
 ** mMol Aldehydgruppen
 *** 22 % w/w (7,7 mMol Aldehydgruppen pro g Polymeres)
 **** Substratlösung wie in Tabelle 7

Zu 3.1.2.1.

Darstellung von Poly(acrolein-co-N-vinyl-2-pyrrolidon)

In einem 300 ml Erlenmeyerkolben mit Thermometer und Gaseinleitungsrohr wurde eine Lösung von 2,16 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ in 160 ml H_2O zehn Minuten mit Reinstickstoff gespült, um gelösten Sauerstoff zu entfernen. Danach wurden unmittelbar nacheinander 26,6 g frisch destilliertes N-Vinyl-2-pyrrolidon (0,24 Mol) und 10,68 ml frisch destilliertes Acrolein (0,16 Mol) zugegeben, während das Durchleiten von N_2 fortgesetzt und die Lösung mit einem Magnetrührer gerührt wurde.

Die Temperatur der Reaktionsmischung stieg innerhalb von 80 Minuten von 24° C auf 33° C an. Danach erfolgte eine allmähliche Abkühlung.

Nach 24 Stunden wurde das Reaktionsgemisch in Dialyseschläuche gefüllt und drei Tage gegen dest. Wasser dialysiert, bis der Geruch nach Acrolein verschwunden war. Die etwas trübe Lösung wurde filtriert und in dieser Form zur Immobilisierung von Mikroorganismen eingesetzt. Es wurden 430 ml Copol-Lösung erhalten. 20 ml der Lösung wurden lyophilisiert, um ihren Gehalt an Polymeren zu bestimmen. Es wurden 802,46 mg getrocknetes Copol gefunden. Daraus ließ sich ein Gehalt von 40,12 mg Copol pro ml Lösung errechnen.

Die Ausbeute der Copolymerisierungsreaktion betrug demnach 17,25 g Poly(acrolein-co-NVP) bzw. 64,5 % (der theoretischen Ausbeute, bezogen auf Acrolein).

Elementaranalyse: $(\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_2)_n$ $\text{MG}_{\text{rep.unit}} = 167,21$

ber.: 64,65 % 7,84 % 8,38 %

gef.: C: 58,10 % H: 7,13 % N: 7,48 %

Aus dem Verhältnis % C : % N = 7,76 konnte ein Gehalt von 50,5 Molprozent Acrolein im Copolymeren berechnet werden.

Zu 3.1.2.1.

Bestimmung des Gehaltes an Aldehydgruppen

Die Bestimmung wurde, wie bereits für Polyacrolein beschrieben, durch Oximtitration durchgeführt (Experimenteller Teil zu 3.1.1.2.).

Es wurden 566 mg Copol-Lyophilisat und 20 ml Reagenzlösung eingesetzt. Die Titration mit 1 N NaOH ergab einen Verbrauch von 3,095 ml. Daraus wurde ein Gehalt von 5,47 mMol Aldehydgruppen pro g Copol berechnet. Dies entsprach einem Gehalt des Copolymeren an Acrolein von 47 Molprozent.

Zu 3.1.2.1.

Variation der Monomeren beim Copolymerisationsansatz

Reaktionsansätze

Nr.	ml H ₂ O	Acrolein		NVP		Molverhältnis
	(+2,16g Na ₂ S ₂ O ₈)	(ml)	(Mol)	(g)	(mMol)	Acrolein/NVP
1	160	5,34	0,08	35,58	0,32	20 : 80
2	161	6,68	0,10	33,36	0,30	25 : 75
3	162	8,00	0,12	31,10	0,28	30 : 60
4	163	9,33	0,14	28,91	0,20	35 : 65
5	164	10,67	0,16	26,69	0,24	40 : 60
6	164	12,02	0,18	24,46	0,22	45 : 65

Die Copolymerisationsreaktion wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Ausbeuten

Nr.	Volumen der dialysierten Copol-Lsg. (ml)	Gehalt der Lsg. an Copol (mg/ml)	Ausbeuten* (%)	Aldehydgruppengehalt** (mMol/g)
1	290	31,39	23	4,67
2	302	39,17	30	4,99
3	298	39,76	31	5,04
4	336	43,08	39	5,08
5	342	43,47	42	5,32
6	493	48,48	65	5,65

* bezogen auf NVP

** bestimmt durch Oximtitration

Proben der gelösten Copolymerisate wurden getrocknet, um eine Elementaranalyse durchführen zu können.

Elementaranalyse

Nr.	gefunden (%)***			Verhältnis % C : % N	Molprozent Acrolein im Copolymerisat (%)****
	C	H	N		
1	55,14	6,95	7,41	7,44	47,0
2	60,98	7,56	8,17	7,46	47,5
3	57,03	7,11	7,66	7,45	47,5
4	59,76	7,32	7,91	7,55	47,5
5	55,06	6,88	7,32	7,52	48,5
6	62,68	7,61	8,14	7,70	49,5

*** ber.: C: 64,65 %, H: 7,84 %, N: 8,38 %

**** berechnet aus dem Verhältnis % C/ % N

Zu 3.1.2.1.

Spontanpolymerisation eines Gemisches aus Acrolein und N-Vinyl-2-pyrrolidon (NVP)

In einem 100 ml Erlenmeyerkolben wurden 7,44 g frisch destilliertes NVP (67 mMol) in 56 ml Wasser gelöst. Ein Stickstoffstrom wurde durch die Lösung geleitet, um den gelösten Sauerstoff zu entfernen.

Nach zehn Minuten wurden 4,47 ml frisch destilliertes Acrolein (67 mMol) zugegeben und die Stickstoffspülung fortgesetzt. Innerhalb von fünf Stunden stieg die Temperatur des Reaktionsgemisches 4° C über die Raumtemperatur.

Nach 24 Stunden wurde die Lösung wie oben beschrieben dialysiert. Die Ausbeute betrug 80 ml der Polymeren-Lösung.

Durch Trocknen einer Probe wurde ein Gehalt von 5,4 mg pro ml Lösung festgestellt. Das entspricht einer Ausbeute von 4 % (der theoretischen Ausbeute).

Die Elementaranalyse ergab $(C_9H_{13}NO_2)_n$, $MG_{rep.unit} = 167,21$:

ber.	C:	64,65%	H:	7,84%	N:	8,38%
gef.		62,09%		7,87%		7,80%

Aus dem Verhältnis % C : % N = 7,75 konnte ein Gehalt von 50,5 Molprozent Acrolein im Copolymeren berechnet werden.

Zu 3.1.2.3.

Darstellung von 1,8-Di(oxyamino)octan (DOA8)

108,8 g (0,4 Mol) 1,8-Dibromoctan wurden in 400 ml absolutem Ethanol gelöst, mit 84,1 g (0,8 Mol) Hydroxycarbamidsäureethylester (81) und 44,9 g·h (0,8 Mol) Kaliumhydroxid versetzt und unter Feuchtigkeitsausschluß sechs Stunden unter Rückfluß gekocht. Danach wurde die Reaktionsmischung im Vakuum eingeeengt und der Rückstand mit Wasser verdünnt.

Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 100 ml Diäthyläther ausgeschüttelt, die Ätherphase mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Die so erhaltenen 130,9 g rohes Zwischenprodukt wurden 2,5 Stunden mit einer Lösung von 160 g Kaliumhydroxid in 320 ml Wasser unter Rückfluß zum Sieden erhitzt.

Nach dem Abkühlen hatte sich eine ölige Phase abgeschieden, die in 200 ml Äther aufgenommen werden konnte. Die Ätherphase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wurde der Rückstand im Vakuum destilliert.

Die Siebfraction von 120° C bis 150° C (0,4 Torr) wurde nochmal destilliert.

Man erhielt 16,43 g Di(oxyamino)octan als farbloses Öl,
Kp: 115° C/0,4 Torr

Das NMR-Spektrum (Abbildung 52) zeigt folgende Signale:

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1,31 ppm (triplett, 8 H)
 δ = 1,52 ppm (triplett, 4 H)
 δ = 3,56 ppm (triplett, 4 H)
 δ = 5,30 ppm (singulett, 4 H)

Zu 3.1.2.3.

Darstellung von 1,8-Di(oxyamino)octan.2HCl

16,33 g 1,8-Di(oxyamino)octan wurden mit 200ml 1N HCl versetzt und die Lösung eingedampft. Der Rückstand wurde aus 93 %igem

Ethanol umkristallisiert. Es wurden 14,83 g Di(oxyamino)octan-
dihydrochlorid erhalten: farblose Nadeln; Fp = 174° C.

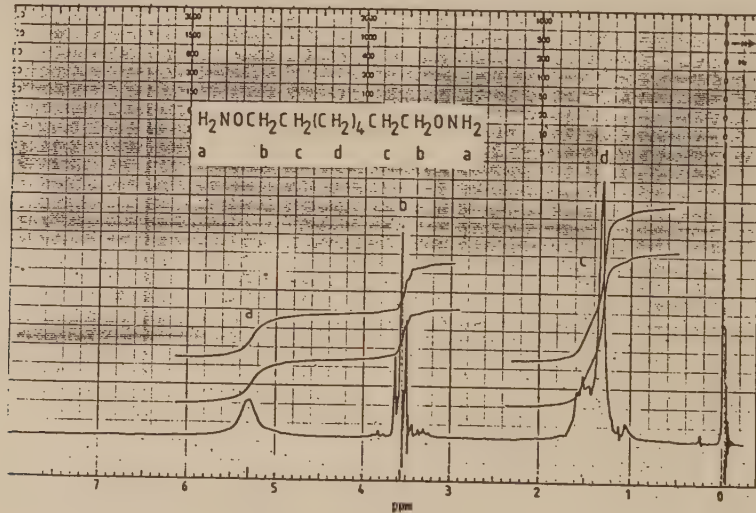
Elementaranalyse: $C_8H_{22}N_2Cl_2O_2$ MG = 249,18

ber.: C: 38,56 % H: 8,90 % N: 11,24 % Cl: 28,46 %

gef.: C: 38,50 % H: 9,11 % N: 11,17 % Cl: 28,42 %

Abbildung 52

100MHz 1H -NMR Spektrum von 1,8-Di(oxyamino)-octan
aufgenommen mit VARIAN XL-100



Zu 3.1.2.3.

Darstellung von 1,5-Di(oxyamino)-3-oxa-pentan.2HCl (DOA05)
aus Diethylenglycol-ditosylat

Zunächst wurde Diethylenglycol-ditosylat nach der Vorschrift von Dale et al (84) hergestellt. 66g (0,16 Mol) dieser Verbindung wurden zusammen mit 33 g (0,32 Mol) Hydroxycarbamidsäure-ethyl-ester und 17,9 g (0,32 Mol) Kaliumhydroxid in 150 ml absolutem Ethanol 6 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Dabei bildete sich allmählich ein farbloser Niederschlag von Kaliumtosylat, der nach dem Abkühlen der Reaktionsmischung abgesaugt wurde. Die klare, alkoholische Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und der verbliebene, ölige Rückstand 2,5 Stunden mit einer Lösung aus 15 g Kaliumhydroxid in 30 ml Wasser refluxiert. Nach dem Abkühlen hatte sich ein farbloses Öl abgeschieden, daß in 50 ml Methylenchlorid aufgenommen wurde. Nach dem Trocknen der Methylenchloridphase über Kalziumchlorid und dem Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer blieben 18,6 g eines farblosen Öls zurück. Das Rohprodukt wurde mit 50 ml 1N HCl versetzt, die entstandene Lösung von etwas Unge- löstem abfiltriert und eingengt. Der Rückstand wurde 24 Stun- den im Vakuumexsiccator über P_4O_{10} getrocknet und danach mit 100 ml Chloroform versetzt. Nach einiger Zeit schieden sich farblose Kristalle ab, die aus Ethanol umkristallisiert wur- den. Die Ausbeute betrug 4,7 g farblose Blättchen. Fp. = 187 °C (unter Zersetzung).

Die Elementaranalyse ergab: $(C_4H_{14}N_2Cl_2O_3, MG = 209,07)$

ber.		22,98	6,75	13,30	33,91
gef.	C:	23,02	H:	6,57	N: 13,41
					Cl: 33,96

Darstellung von 1,8-Di(oxyamino)-3,6-dioxa-octan.2HCl (DOAD08)
aus Triethylenglycol-ditosylat

Die Ausgangsverbindung wurde ebenfalls nach der Vorschrift von Dale et al (84) hergestellt.

72 g (0,16 Mol) des Ditosylats wurden ebenso mit Hydroxy- carbamidsäure-ethylester umgesetzt, wie oben beschrieben.

Die Ausbeute betrug hier 4,1 g farbloser Blättchen Fp. = 150 °C (unter Zersetzung).

Die Elementaranalyse ergab: $(C_6H_{18}N_2Cl_2O_4, MG = 253,13)$

ber.		28,47	7,17	11,07	28,01
gef.	C:	28,49	H:	7,08	N: 11,31
					Cl: 28,39

Zu 3.1.2.3.

Darstellung von Chloramin

Die Darstellung von Chloramin erfolgte nach einer Vorschrift von Theilacker et al. (105), die von handelsüblichen Natriumhypochlorit- und Ammoniaklösungen ausgeht:

In einem 2 l Becherglas wurden 260 ml einer 13 %igen (w/w) Natriumhypochloritlösung (0,454 Mol) zusammen mit 1 l Äther in einer Eis-Kochsalz-Mischung auf -6°C bis -8°C gekühlt. Unter starkem Rühren (Magnetrührer) wurden in einem Guß 34 ml (0,454 Mol) eiskalte Ammoniaklösung (25 %, w/w) zugegeben. Unter starkem Aufschäumen erfolgte die Reaktion. Dabei stieg die Temperatur der Mischung auf 15°C bis 20°C an.

Das Rühren wurde fortgesetzt, um eine gute Verteilung des gebildeten Chloramins zwischen der wässrigen und der ätherischen Phase zu ermöglichen. Nach zehn Minuten wurde die Ätherphase abgetrennt und eine Stunde in einem Eisbad über wasserfreiem Kalziumchlorid getrocknet.

Der Gehalt der Lösung an Chloramin wurde jodometrisch bestimmt (s. u.). Im allgemeinen ergab die Bestimmung eine Ausbeute von 0,17 bis 0,18 Mol Chloramin.

Zu 3.1.2.3.

Bestimmung des Gehaltes an Chloramin

10 ml der getrockneten ätherischen Lösung wurden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit ca. 10 ml 0,2 N Kaliumjodidlösung und 5 ml 1 N HCl versetzt. Das ausgeschiedene Jod wurde mit einer 0,1 N Thiosulfatlösung titriert.

1 ml 0,1 N Thiosulfatlösung entsprechen dabei 2,57 mg Chloramin.

Zu 3.1.2.3.

Darstellung von Di(oxyamino)-alkan-dihydrochloriden und Di(oxyamino)-oxyethylen-dihydrochloriden mit Chloramin

Variante A Umsetzungen mit Diolen bei Raumtemperatur

0,1 Mol des betreffenden Diols wurde in 100 ml tert. Butanol mit 4,6 g Na-Metall unter Rückfluß erhitzt, bis alles Metall

abreagiert war. Nach dem Abkühlen wurden die Alkoholat-Lösung und 1 l der ätherischen Chloramin-Lösung gemischt und bei Raumtemperatur 24 Stunden stehengelassen.

Variante B Umsetzungen mit Diolen bei 80° C

Es wurde in gleicher Weise das Alkoholat des betreffenden Diols hergestellt, aber mit 150 ml trockenem Dioxan als Lösungsmittel und in einem 500 ml Dreihalskolben. Nachdem alles Na-Metall abreagiert war, wurde der Kolben mit einem Innenthermometer, Tropftrichter und einer 80 cm langen Füllkörperkolonne (Raschig-Ringe) versehen. Unter Rühren mit einem Magnetrührer wurde bei 150° C Badtemperatur die ätherische Chloramin-Lösung (11) so rasch in die Alkoholat-Lösung eingetropft, daß die Innentemperatur 80° C betrug. Dabei destillierte der Äther über die Kolonne ab. Nachdem alles zugetropft war, ließ man das Reaktionsgemisch abkühlen.

Aufarbeitung (Variante A und B)

Das Reaktionsgemisch wurde vom gebildeten NaCl abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der ölige Rückstand wurde mit 1 N HCl bis zur sauren Reaktion (pH =2) versetzt und nochmals am Rotationsverdampfer abgezogen. Das Rohprodukt wurde am Vakuumexsikkator über P_4O_{10} getrocknet. Entweder schied sich gleich festes Dioxydiamin-dihydrochlorid ab oder das ölige Rohprodukt wurde mit 50 ml Chloroform behandelt bis sich Kristalle abschieden, die abgesaugt werden konnten. Die so gewonnenen Produkte wurden aus Ethanol umkristallisiert.

Die Tabelle 9 zeigt die im einzelnen erzielten Ausbeuten, sowie die Schmelzpunkte und die Werte aus der Elementaranalyse.

Tabelle 9
Darstellung verschiedener Vernetzer durch Umsetzungen von Diolen mit Chloramin

Produkt	Abk.	Diol	Vari- ante	Aus- beute*	Sp. °C	Elementaranalyse C H N	%ber. %gef. Cl
1,4-Di(oxyamino)-butan- dihydrochlorid	DOA4	$\text{HO}(\text{CH}_2)_4\text{OH}$	B	35 %	240	24,88 7,31 14,51 24,64 7,76 14,12	
1,3-Di(oxyamino)-propan- dihydrochlorid	DOA3	$\text{HO}(\text{CH}_2)_4\text{OH}$	B	42 %	168	20,12 6,76 15,65 20,98 7,07 15,25	
1,2-Di(oxyamino)-ethan- dihydrochlorid	DOA2	$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	B	49 %	176**	14,56 6,11 16,98 16,77 6,06 13,04	
1,5-Di(oxyamino)-3-oxa- pentan-dihydrochlorid	DOAO5	$\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{H}$	B	50 %	187**	22,98 6,75 13,40 23,20 6,87 13,74	33,91 33,67
1,8-Di(oxyamino)-3,6- dioxaoctan-dihydrochlorid	DOADO8	$\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{H}$	B	62 %	150**	28,47 7,17 11,07 28,51 7,27 11,27	28,03 28,03
1,11-Di(oxyamino)-3,6,9- trioxa-undecan-dihydro- chlorid	DOATO11	$\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{H}$	A	50 %	141**	32,33 7,46 9,34 32,63 7,74 9,59	
1,14-Di(oxyamino)-3,6,9, 12-tetraoxa-tetradecan- dihydrochlorid	DOATO14	$\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_5\text{H}$	B	48 %	138**	35,20 7,68 8,21 35,22 7,70 8,73	

* Ausbeute bezogen auf Chloramin

** unter Zersetzung

*** hergestellt durch fraktionierte Destillation aus Polyethylenglycol 200 (Merck)

Zu 3.1.2.3.

NMR-Spektren verschiedener Di(oxyamino)-oxyethylene

Etwa 1 g der Dihydrochloride von DOAO5, DOADO8 und DOATO11 wurden mit 1 N NaOH versetzt, bis der pH-Wert der Lösung ungefähr 8 betrug. Durch Ausschütteln mit Methylenchlorid wurden kleine Mengen der freien Basen erhalten, von denen ^1H -NMR-Spektren (270 MHz) aufgenommen wurden (Gerät: Bruker WH-270).

Dabei wurden folgende Signale erhalten (innerer Standard: TMS):

1) 1,5-Di(oxyamino)-3-oxa-pentan

^1H -NMR(DMSO, d_6)	$\delta = 3,53$ ppm (triplett, 4H)
(Abbildung 53)	$\delta = 3,64$ ppm (triplett, 4H)
	$\delta = 5,94$ ppm (singulett, 4H)

2) 1,8-Di(oxyamino)-3,6-dioxa-octan

^1H -NMR(DMSO, d_6)	$\delta = 3,52$ ppm (triplett, 8H)
(Abbildung 54)	$\delta = 3,65$ ppm (triplett, 4H)
	$\delta = 5,87$ ppm (singulett, 4H)

3) 1,11-Di(oxyamino)-3,6,9-trioxa-undecan

^1H -NMR(DMSO, d_6)	$\delta = 3,52$ ppm (triplett, 12H)
(Abbildung 55)	$\delta = 3,65$ ppm (triplett, 4H)
	$\delta = 5,98$ ppm (singulett, 4H)

Abbildung 53

^1H -NMR-Spektrum von 1,5-Di(oxyamino)-3-oxa-pentan

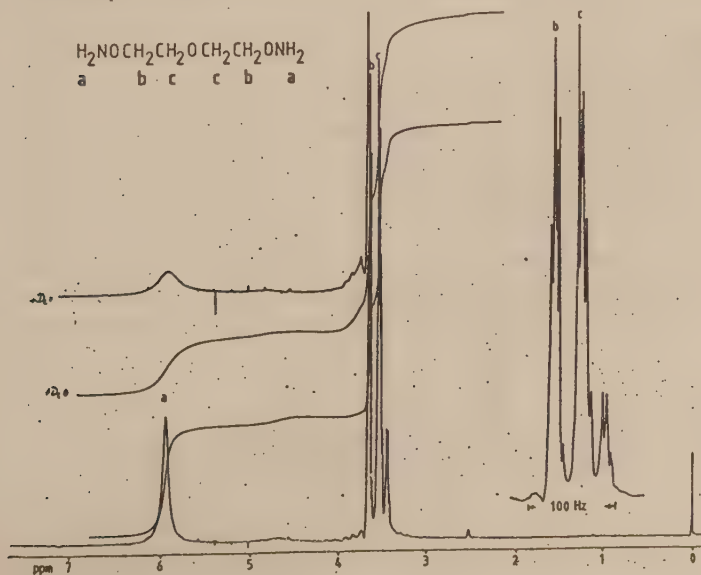


Abbildung 54

^1H -NMR-Spektrum von 1,8-Di(oxyamino)-3,6-dioxa-octan

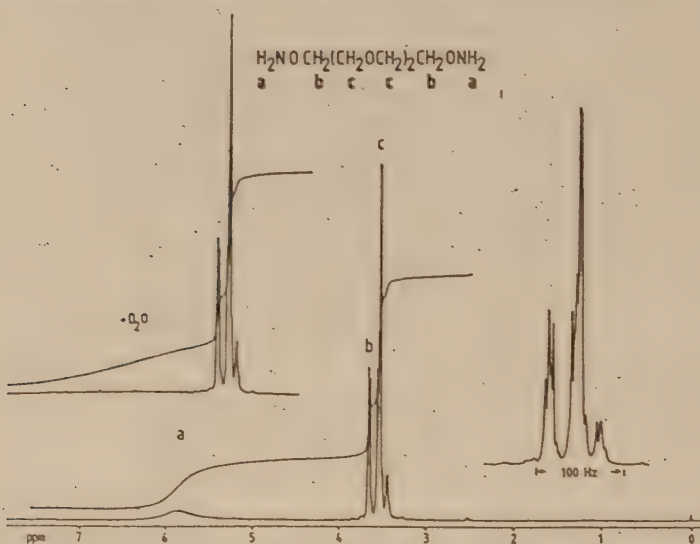
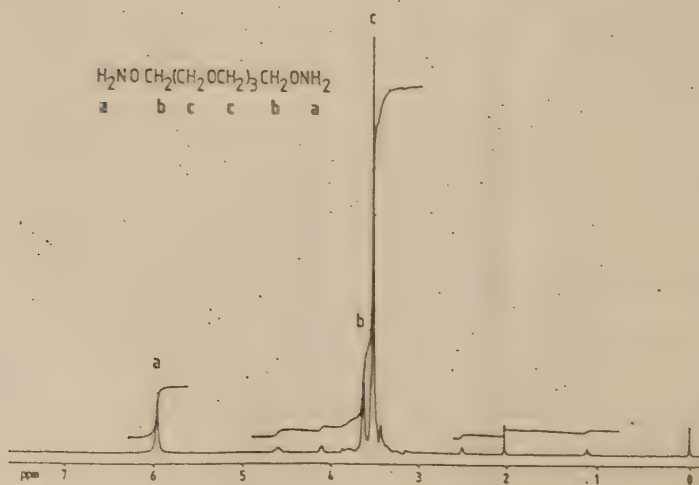


Abbildung 55

^1H -NMR-Spektrum von 1,11-Di(oxyamino)-3,6,9-trioxa-undecan



Zu 3.1.2.4.

Aufnahme der Titrationskurven

Ca. 1 mMol des betreffenden Dioxyamin-dihydrochlorids wurde in 5 ml Wasser gelöst und in einem Metrohm-Titriergefäß unter Stickstoff mit 1 N NaOH titriert. Die Messung des pH-Wertes erfolgte mit einer Einstab-Meßkette und einem Digital-pH-Meter (Metrohm E 500). Die Zugabe der Lauge erfolgte durch eine Kolbenbürette (Metrohm Dosimat E 535), wobei die Dosierung im Bereich größerer pH-Wert-Änderungen in 10 µl-Schritten, sonst in 100 µl-Schritten erfolgte.

Zu 3.1.2.5.

Einschließung von C. simplex und B. sphaericus in vernetzte Poly(acrolein-co-NVP)-Gele

Die Immobilisierungsreaktion erfolgte in der gleichen Weise wie sie in Kapitel 3.1.1.1. für vernetzte PEI-Gele beschrieben worden ist.

Auch hier wurden die einzuschließenden Zellen zunächst mit einer Lösung des Copolymeren (40,12 mg/ml) glattgerührt. Die Vernetzung erfolgte jedoch bei Zimmertemperatur, indem eine der Reaktionsgleichung entsprechende äquimolare Menge des Vernetzers unter kräftigem Rühren zugegeben wurde. Der Vernetzer war dabei in Wasser gelöst mit einer Konzentration von 0,5 mMol/ml. Die Lösung war vorher für DOA6 und DOA8 auf pH = 4,5, für alle übrigen Vernetzer auf pH = 7 eingestellt.

Die Einschließungsreaktion verlief innerhalb von Sekunden, und die Immobilisate fielen als hellbraunes, klumpiges Gel an. Bei der Verwendung von DOA6 und DOA8 als Vernetzer wurden sofort ca 5ml Phosphat-Puffer zugegeben, um ein zu starkes Absinken des pH-Wertes zu vermeiden. Die Gele wurden nach 5 Minuten grob zerkleinert und sofort naß gesiebt. Auch hier wurden Siebfraktionen zwischen 0,1 und 0,5 mm Durchmesser aufgefangen und durch Absaugen auf einer Fritte von überschüssiger Feuchtigkeit befreit. Die Aufbewahrung erfolgte kurzfristig bei 4°C, sonst bei -30°C.

Zu 3.1.3.

Bestimmung der Steroid-Konzentration durch Spektralphotometrie

Die Konzentrationsmessung der gelösten Steroide erfolgte durch Einbringen der zu untersuchenden Lösung in eine 1 mm Durchflußküvette eines Zweistrahlphotometers (Perkin Elmer Modell 555). Es wurde gegen Luft gemessen. Das Gerät wurde mit einem Wellenlängenprogramm betrieben, wobei automatisch nacheinander die Wellenlängen 320 nm, 280 nm und 264 nm angefahren wurden. Die Extinktion bei 320 nm wurde als Nullwert betrachtet und von den Extinktionen bei 280 nm und 264 nm subtrahiert. Die Gesamtsteroid-Konzentration betrug normalerweise 1 mMol/l. Höher konzentrierte Proben wurden entsprechend verdünnt.

Die Umwandlungsraten wurden nach folgenden Gleichungen bestimmt:

$$\% \text{ gebildetes Prednisolon} = \frac{5,3 \cdot E_{280} - 0,47 \cdot E_{264}}{0,0131068}$$

$$\% \text{ umgewandeltes Hydrocortison} = \frac{3,17 \cdot E_{264} - 7,86 \cdot E_{280}}{0,0131068}$$

(für 1 mMol/l Gesamtsteroid-Konzentration)

Zu 3.1.3.

Bestimmung der Steroid-Konzentration durch Differential-Puls-Polarographie (DPP)

1 ml des die Steroide in einer Gesamtkonzentration von 1,0 mMol/l enthaltenden Phosphat-Puffers wurde bis auf 10 ml mit Leitelektrolyt (25 mMol/l Na_2HPO_4 , 25 mMol/l KH_2PO_4 , 0,1 Mol/l NH_4Cl ; pH = 6,69) aufgefüllt und mit dem Polarographiestand (Metrohm E 505) vermessen.

Die Messung erfolgte unter den folgenden Bedingungen und mit den folgenden Geräteeinstellungen:

Meßmethode:	DPP
Arbeitselektrode:	tropfende Quecksilberelektrode
	Tropfgeschwindigkeit: 1 mg/sec
	Tropfzeit: 1 sec
Meß- und Hilfselektroden:	Ag / AgCl / 3,0 M KCl
Entlüftung:	10 Min mit N ₂ (99,99 %)
Startpotential:	- 0,8 V
Spannungsbereich:	- 1,0 V
Pulsamplitude:	- 40 mV
Stromempfindlichkeit:	1,5 · 10 ⁻⁹ A/mm
Dämpfung:	Stufe 0
Papiervorschub:	1 mm/sec
Spannungsvorschub:	4 mV/sec

Es wurden Peaks für Prednisolon bei ca. - 1,16 V und für Hydrocortison bei ca. - 1,40 V erhalten.

Da die Peaks sich gegenseitig beeinflussen, wurde die Steroid-Konzentration analog eines von Kabasakalian et al. (106) angewandten Gleichungssystems berechnet.

$$\text{Hydrocortison} = \frac{24 h_2 - 4,75 h_1}{18820} \quad \frac{\text{mMol}}{1}$$

$$\text{und Prednisolon} = \frac{10 h_1 - h_2}{18820} \quad \frac{\text{mMol}}{1}$$

wobei h_1 bzw. h_2 die Peakhöhen in mm von Prednisolon bzw. Hydrocortison bedeuten. Die Zahlen in den Gleichungen wurden durch Eichmessungen an den reinen Substanzen ermittelt. Es handelt sich um dasselbe Rechenprinzip, wie es oben für die UV-spektroskopische Bestimmung von Hydrocortison und Prednisolon angewandt wurde.

Zu 3.1.4.

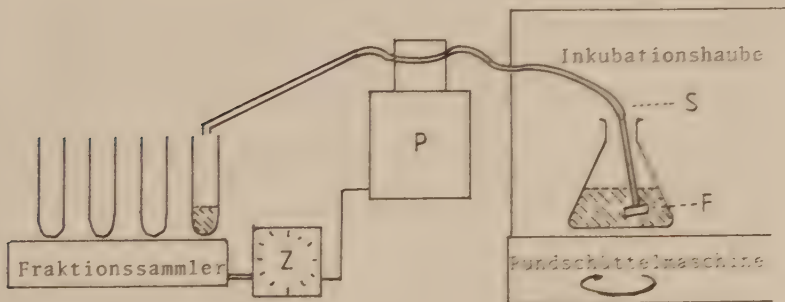
Durchführung der Steroid-Umwandlung

In einem 100 ml Erlenmeyerkolben wurden 1 g immobilisierte Zellen (Feuchtmasse, in 50 ml Phosphat-Puffer suspendiert und in einer thermostatisierbaren Randschüttelmaschine bei 30° C und 160 U/Min. inkubiert. Zum Zeitpunkt Null erfolgte die Zugabe des Substrates, z. B. 250 µl einer Lösung von 0,2 Mol Hydrocortison in 1 l DMF, so daß die Substratkonzentration im Test 1,0 Mol/l betrug.

Gegebenenfalls wurden noch 250 µl einer Lösung von 0,1 Mol/l Menadion in DMF zugegeben.

In Abständen von ein bis zwei Stunden wurde die Schüttelmaschine kurzzeitig gestoppt. Nachdem die Immobilisate sich abgesetzt hatten, wurden von der überstehenden Lösung Proben von je einem ml entnommen und der Steroid-Bestimmung zugeführt.

Mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe, einer Zeitschaltuhr und eines Fraktionensammlers wurde auch ein automatisches Probenentnahmeverfahren realisiert, dessen Arbeitsweise anhand der folgenden Skizze verdeutlicht werden soll.



Die peristaltische Pumpe P wurde durch die Zeitschaltuhr Z so gesteuert, daß sie normalerweise durch den Schlauch S und die Fritte F Luft in das sich im Rundschüttler befindliche Reaktionsgefäß pumpte. In den letzten vier Minuten einer vollen Stunde kehrte ein durch die Zeitschaltuhr gesteuertes Relais die Drehrichtung der Pumpe um, so daß jetzt Lösung aus dem Reaktionsgefäß zum Fraktionssammler befördert wurde. Die Pumpgeschwindigkeit war so geregelt, daß gerade 1 bis 1,5 ml Volumen abgenommen wurden. Am Ende des Entnahmezyklus förderte die Pumpe wieder in Richtung Erlenmeyerkolben. Außerdem schaltete der Fraktionssammler einen Schritt weiter. Der besondere Vorteil dieses Verfahrens lag darin, daß Lösung, die sich im Schlauch befand, wieder in das Reaktionsgefäß zurückgepumpt wurde, also letztendlich kein Totvolumen entstand. Bei Verwendung einer mehrkanaligen peristaltischen Pumpe wurden bis zu vier Proben gleichzeitig abgenommen.

Zu 3.1.4.2.

Abhängigkeit der Aktivität der Immobilisate von der Zellbeladung

Um den Einfluß der Zellbeladung auf die Aktivität der Immobilisate zu untersuchen, wurden an *C. simplex* Immobilisierungsversuche mit PEI und dem Vernetzer Glutaraldehyd sowie mit Copol und dem Vernetzer DOA8 durchgeführt. Dabei wurde die angebotene Zellmenge im Verhältnis zur polymeren Matrix variiert. Die Reaktionsbedingungen waren die gleichen wie oben beschrieben.

Die Reaktionsansätze und die erzielten Ausbeuten sind in den Tabellen 9 und 10 dargestellt.

Tabelle 9

Variation des Zellgehaltes bei PEI-GA-C. simplex

Nr.	PEI-Lsg. (ml)	Glutaraldehyd-Lsg. (ml)	C. simplex angeboten (mg)	ausgewaschen (mg)*	Zellgehalt (%)**	Ausbeuten (Naßgewicht) (g) Siebfraktionen		Aktivitäts- ausbeute (%)
						0,1-0,2 mm	0,2-0,5 mm	
1	5,6	1,98	200	5	20	1,09	7,97	5
2	4,5	1,65	333	5	33	0,44	7,59	6
3	3,4	1,23	500	4	50	0,57	4,55	15
4	2,3	0,83	660	22	65	2,04	1,82	55
5	1,3	0,5	800	96	78	0,67	1,56	60

* bestimmt, wie in Kapitel 3.1.1.1. beschrieben

** berechnet unter Berücksichtigung der ausgewaschenen Zellen

Tabelle 10

Variation des Zellgehaltes bei Copol-DOA8-C. simplex

Nr. (ml)	Copol-Lsg. 1) (ml)	DOA8-Lsg. 2) (ml)	C. simplex		Zellgehalt (%) 5)	Ausbeuten (Naßgewicht) (g) Siebfraktionen		Aktivitätsausbeute (%) 6)
			angeboten (mg) 3)	ausgewaschen (mg)		0,1-0,2 mm	0,2-0,5 mm	
1	14,4	3,12	200	10	20	1,50	4,93	28
2	10,8	2,34	400	10	39	1,42	3,78	72
3	7,2	1,56	600	50	58	2,35	2,30	93
4	3,6	3,12	800	200	75	1,05	0,50	95

1) 40,12 mg/ml (Aldehydgruppengehalt: 5,47 mMol/g)

2) 0,5 Mol/l

3) Trockenpulver

4) bestimmt, wie in Kapitel 3.1.1.1. beschrieben

5) berechnet unter Berücksichtigung der ausgewaschenen Zellen

6) Substratlösung wie in Tabelle 7

Zu 3.1.4.3. bis 3.1.4.8

Die Untersuchungen der Abhängigkeit der Aktivität der Immobilisate von verschiedenen Faktoren wie pH-Wert, Temperatur, Cofaktor und Substratkonzentration wurden, wenn im Text nicht anders beschrieben, unter den in Kapitel 3.1.4. auf Seite 52 aufgeführten Reaktionsbedingungen durchgeführt.

Zu 3.1.4.8

Bestimmung des Verteilungskoeffizienten

Zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von Hydrocortison zwischen der wässrigen und der Gelphase wurden je 1-2 g der in der Tabelle auf Seite 78 aufgeführten Immobilisate zunächst durch 15minütiges Behandeln bei 95-100°C im Wasserbad desaktiviert. Danach wurde ihr Volumen bestimmt, indem sie in einen 10 ml Meßzylinder eingefüllt und mit genau 5 ml 1,0 mMol/l Hydrocortison-Lösung (in Phosphat-Puffer) versetzt wurden. Anschließend wurden sie mit dem insgesamt 10fachen ihres eigenen Volumens an Phosphat-Puffer in einen Erlenmeyerkolben überführt und unter den Bedingungen der Steroid-Transformation 3 Stunden bei 30°C geschüttelt. Danach wurde die Hydrocortisonkonzentration in der wässrigen Phase mittels Spektralphotometrie bestimmt.

Zu 3.1.4.9

Steroid-Bestimmung bei der Umwandlung an festem Substrat

Das zu untersuchende Reaktionsgemisch wurde durch ein Nylon-sieb mit 0,1 mm Maschenweite filtriert und mit insgesamt 250 ml Phosphat-Puffer nachgewaschen. Dabei blieben die Immobilisate auf dem Sieb liegen, während die mikrokristallinen Steroide in der Waschlösung fein verteilt vorlagen.

1 ml der gut gerührten Waschflüssigkeit wurde mit einem weiteren ml Phosphat-Puffer versetzt und bis zur Lösung der Kristalle geschüttelt. In dieser Lösung konnte die maximale Gesamt-Steroidkonzentration 1,0 mMol/l betragen. Sie wurde, wie in Kapitel 3.1.3.1. beschrieben, spektralphotometrisch analysiert.

Zu 3.2.

Umsetzung von Synthesepulp mit 2-(3-Aminophenyl)-1,3-dioxolan

Die Reaktion wurde wie bei G. Manecke und H.-G. Vogt (102) beschrieben, durchgeführt.

Es wurden 10 g Synthesepulp in salzsaurer Lösung mit 2 ml 2-(3-Aminophenyl)-1,3-dioxolan umgesetzt.

Darstellung der reaktiven Synthesepulpe VI a und VI b

Auch hier erfolgte die Darstellung analog zu G. Manecke und H.-G. Vogt (103).

Covalente Bindung von C. simplex an VI a und VI b

300 mg C. simplex Trockenpulver wurden mit 10 ml Phosphat-Puffer glattgerührt, im Eisbad gekühlt, unter Rühren mit 300 g aktiviertem Synthesepulp VI a oder VI b versetzt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Bestimmung der Menge gebundener Zellen wurden die Immobilisate gewaschen und die Waschflüssigkeiten in tarierten Gefäßen 30 Minuten bei 4000 U/Min. zentrifugiert.

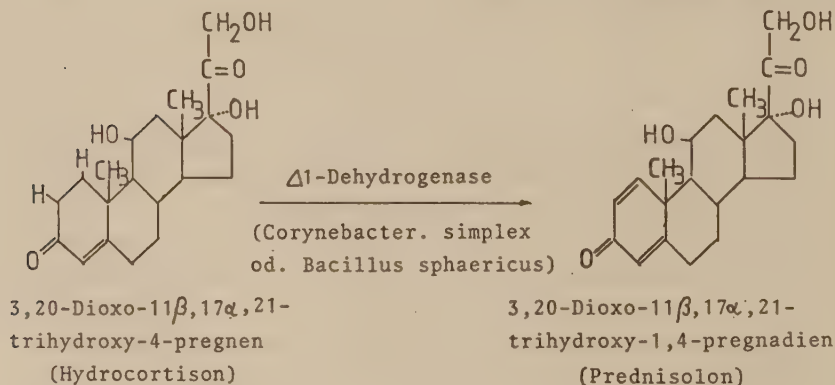
Nach dem Abgießen der überstehenden Flüssigkeit wurde durch Wägung die Menge der nicht gebundenen Zellen bestimmt. Dabei entsprachen 1,02 g abzentrifugierter Zellmasse einem Trockengewicht von 300 mg.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, Mikroorganismen dadurch zu immobilisieren, daß sie in eine polymere Matrix eingeschlossen oder an eine polymere Matrix covalent gebunden werden sollten.

Dabei wurde von bereits bekannten und auch für diesen Zweck neuentwickelten wasserlöslichen und reaktiven Polymeren ausgegangen, die in Gegenwart von Bakterien durch bi- oder multifunktionelle Reagentien zu einem mechanisch stabilen Gel vernetzt werden sollten. Weiterhin wurden bereits bei der Immobilisierung von Enzymen entwickelte Methoden der covalenten Bindung an einen polymeren Träger auf ganze Zellen angewandt.

Die im einzelnen entwickelten Immobilisierungsverfahren wurden an den Bakterien *Corynebacterium simplex* (ATCC Nr. 6946) und *Bacillus sphaericus* (ATCC Nr. 7054) getestet. Beide Mikroorganismen werden als Biokatalysatoren bei der Steroid-Umwandlung eingesetzt, wobei das Enzym Δ^1 -Dehydrogenase die Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon bewirkt.



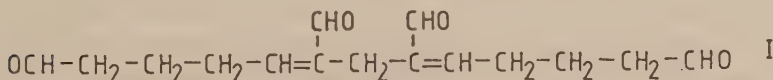
Beide Steroide besitzen eine entzündungshemmende Wirkung, wobei Prednisolon vielfach aktiver ist als Hydrocortison und weniger Nebenwirkungen besitzt.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Immobilisierungsmethoden lassen sich in drei Gruppen einteilen:

- 1) Einschließung von Mikroorganismen in vernetzte Poly(ethylenimin)-Gele
- 2) Einschließung von Mikroorganismen in vernetzte Poly[acrolein-co-(N-vinyl-2-pyrrolidon)]-Gele
- 3) Covalente Bindung von Mikroorganismen an aktivierten Poly(vinylalkohol) enthaltenden Synthesepulp

Poly(ethylenimin) (PEI) wurde mit Glutaraldehyd (GA) oder mit der wasserlöslichen Poly(acrolein)-Bisulfitadditionsverbindung (PA) vernetzt. Hierbei reagierte das verzweigte, auch primäre und tertiäre Aminogruppen enthaltende Polymere mit den Aldehydgruppen des Vernetzers unter Ausbildung von Schiffischen Basen und Enaminen.

Im Falle des Glutaraldehyd wurde angenommen, daß der Vernetzer durch Aldolkondensation oligomere Aldehyde wie



ausbildet. Die mit den primären Aminogruppen des verzweigten PEI gebildeten Schiffischen Basen sind in diesem Fall durch die α,β -ständigen Doppelbindungen resonanzstabilisiert. In dieser strukturellen Besonderheit wird der Grund dafür gesehen, daß die vernetzten Gele stabil waren und nicht durch Hydrolyse wieder zerfielen, wie es bei gewöhnlichen Schiffischen Basen der Fall gewesen wäre.

Bei der Vernetzung des PEI durch PA entstand wahrscheinlich ebenfalls durch Schiffische Basen- oder Enamin-Bildung ein sogenanntes Verbundpolymeres (68), wobei die Stabilisierung des Gels durch die polymere Struktur der Reaktionspartner begründet war.

Die oben beschriebenen Vernetzungsreaktionen wurden in Gegenwart von *Corynebacterium simplex* (C. simplex) oder *Bacillus*

sphaericus (B. sphaericus) durchgeführt. Die dabei entstandenen Gele wurden zerkleinert und gesiebt. Partikel von 0,1 mm bis 0,5 mm Durchmesser wurden aufgefangen und als Biokatalysatoren zur Steroid-Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon eingesetzt.

Bei der Vernetzungsreaktion wurde die zugegebene Menge Vernetzer variiert, um gute mechanische Eigenschaften und katalytische Aktivitäten zu kombinieren. Hier erwies sich die Zugabe von 0,8 Mol Aldehydgruppen bei GA oder von 0,6 Mol Aldehydgruppen bei PA pro Mol PEI-Wiederholungseinheit als günstig.

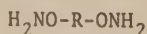
Die weiteren Eigenschaften der PEI-Immobilisate werden später im Zusammenhang mit anderen Immobilisaten beschrieben.

Es wurde auch Poly[acrolein-co-(1Vinyl-2-pyrrolidon)] als Ausgangspolymeres für die Einschließung von C. simplex und B. sphaericus eingesetzt.

Zunächst wurde das Monomergemisch in wässriger Lösung mit dem Initiator Kaliumperoxydisulfat copolymerisiert, wobei ein kleiner Überschuß an NVP notwendig war, um zu wasserlöslichen Produkten zu gelangen. Aus IR-spektroskopischen Untersuchungen, insbesondere durch einen Vergleich der Intensitäten der Aldehyd-Carbonylschwingung von Poly[acrolein-co-(1Vinyl-2-pyrrolidon)] und von Poly(acrolein), konnte gefolgert werden, daß die Acrolein-Bausteine in der Polymer-Kette nicht benachbart auftraten.

Da außerdem trotz Variation des Monomeren-Verhältnisses bei der Copolymerisation die Stickstoffanalyse des Produktes immer ein 1 : 1 Polymeres ergab, wurde angenommen, daß Acrolein und NVP unter den vorliegenden Bedingungen alternierend copolymerisieren.

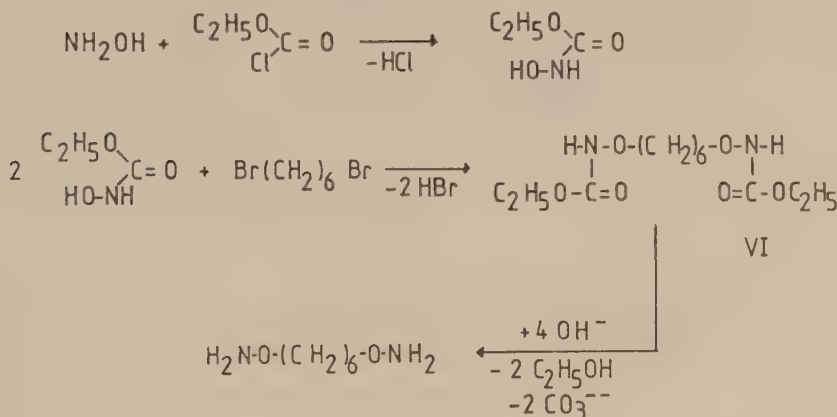
Das Copolymere wurde als wässrige Lösung mit einem Gehalt von 34,17 mg/ml zur Immobilisierung von Mikroorganismen eingesetzt. Als Vernetzer wurden Dioxydiamine eingesetzt, die folgende Struktur besaßen:



mit $\text{R} = -(\text{CH}_2)_n-$ und $n = 2, 3, 4, 6$ und 8

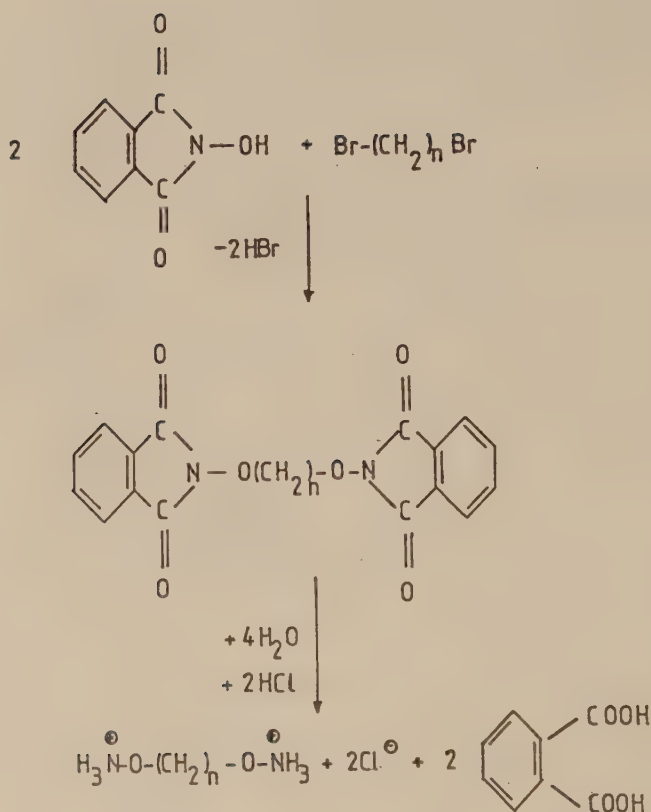
oder $\text{R} = -\text{CH}_2(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_n\text{CH}_2-$ mit $n = 1, 2, 3$ und 4

Di(oxyamino)-hexan wurde nach einem bekannten Verfahren (82) durch Umsetzung von 1,6-Dibromhexan mit Hydroxycarbamidsäure-ethylester und anschließender Hydrolyse der Urethan-Gruppen gewonnen.



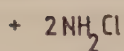
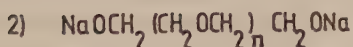
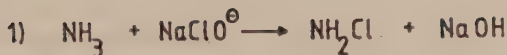
In analoger Weise konnte erstmalig Di(oxyamino)-octan in 23 %iger Ausbeute erhalten werden.

Die anderen Alkylendioxydamine waren nach einer ebenfalls bekannten Methode (82) aus N-Hydroxyphthalimid und den entsprechenden Dibromalkanen zugänglich, wobei hier jedoch anders als in der Originalvorschrift die Verseifung der als Zwischenprodukt entstandenen Di(phthalimidooxy)-alkane durch HCl statt HBr erfolgte und Dioxydamine als Dihydrochloride erhalten wurden.



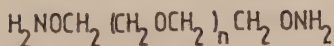
Die Oxaalkylendioxydiamine $\text{H}_2\text{NOCH}_2-(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{CH}_2\text{ONH}_2$ waren bislang in der Literatur nicht beschrieben.

Zu ihrer Herstellung wurde von Ethylenglycol und oligomeren Ethylenglycol ausgegangen, die zunächst mit Na-Metall zu Bisalkoholaten umgesetzt wurden. Aus diesen ließ sich durch Reaktion mit Chloramin in einem Eintopfverfahren das gewünschte Dioxydamin herstellen.



A) 25° tert. Butanol

B) 80° Dioxan



$$n = 0, 1, 2, 3, 4$$

Die Immobilisierung von *C. simplex* und *B. sphaericus* erfolgte in der gleichen Weise wie bei den PEI-Immobilisaten durch Mischen der Mikroorganismen mit der Lösung des Copolymeren und der Zugabe des Vernetzers als wässrige Lösung.

Die Gelbildung erfolgte sekundschnell. Nach dem Zerkleinern der Polymer-Zell-Konjugate konnten in den meisten Fällen mechanisch stabile Gelpartikel ausgesiebt werden. Nur bei der Verwendung des aus Pentaethylenglycol entstandenen Vernetzers waren die Partikel zu weich.

Die Steroid-Umwandlungen mit den eingeschlossenen Mikroorganismen wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 30° C in einem Inkubationsschüttler durchgeführt. Die Substratlösung bestand aus 0,5 bis 2,0 mMol/l Hydrocortison und 1 % DMF in Phosphat-Puffer. Der Reaktionsverlauf wurde durch eine quantitative Bestimmung der Steroide verfolgt, wobei hauptsächlich die UV-Spektroskopie und die Differential-Puls-Polarographie zur Anwendung kamen.

Es wurde die Abhängigkeit der Aktivität der Biokatalysatoren von verschiedenen Faktoren wie Zellgehalt, Reaktions-Temperatur, pH-Wert, Cofaktor-Zusatz und Substratkonzentration untersucht.

Die Aktivitätsausbeute, die ein Maß für die nach der Immo-

lisierung gefundenen Aktivität darstellt, war von der Zellbeladung der Biokatalysatoren abhängig. Da ein hoher Zellgehalt zwar die höchsten Aktivitätsausbeuten aber ungünstige mechanische Eigenschaften hervorrief, erwiesen sich bei den PEI-Immobilisaten Zellgehalte von 60 % und bei den Acrolein-NVP-Copolymerisaten Zellgehalte von 50 % als am günstigsten. Die Aktivitätsausbeuten betrugen in diesem Fall 50 % bei den PEI- und 85 % bei den Copolymer-Immobilisaten.

Ein pH-Wert von 7 und eine Reaktionstemperatur von 30° C waren für die Aktivität sowohl der immobilisierten, als auch der freien Zellen optimal, jedoch zeigten die eingeschlossenen Bakterien eine höhere Thermostabilität und waren unempfindlicher gegenüber pH-Wert-Änderungen.

Durch die Zugabe eines externen Cofaktors wie Menadion, der als Elektronenüberträger diente, konnte die Aktivität der eingeschlossenen Zellen mehr als verdoppelt werden. Jedoch wurde bei mehrfach wiederholten Umsetzungen mit demselben Immobilisat die Halbwertszeit der Aktivität durch Menadion drastisch verkürzt, wie in dem in Abbildung 42 auf Seite 96 dargestellten Langzeitversuch demonstriert ist.

Die Substratkonzentration übte in der Weise einen Einfluß auf die Aktivität der eingeschlossenen Zellen aus, daß bei einer Hydrocortison-Konzentration von etwa 1,0 mMol/l ein Aktivitätsmaximum auftrat und oberhalb dieser Konzentration eine Substrathemmung beobachtet wurde. Nur bei der Anwesenheit von Menadion wurde keine Substrathemmung beobachtet.

In diesem Fall wurden für die einzelnen Immobilisate die scheinbaren Konstanten der Michaelis-Menten-Kinetik $K_{M(app.)}$ und V_{max} bestimmt. Es zeigte sich, daß die $K_{M(app.)}$ -Werte von 1,2 mMol/l bis 2,0 mMol/l variierten und damit nicht wesentlich über denen der freien Zellen (1,1 mMol/l) lagen. Daraus konnte geschlossen werden, daß die polymere Matrix nur wenig die Diffusion von Substrat und Produkt behinderte.

Besonderes Gewicht wurde auf Untersuchungen der Lebens- und Vermehrungsfähigkeit der eingeschlossenen Zellen gelegt.

Freie *C. simplex* Zellen sind in der Lage, bei Inkubation mit

Hydrocortison-Lösung das Enzym $\Delta 1$ -Dehydrogenase vermehrt zu bilden und dadurch ihre Aktivität beträchtlich zu erhöhen (Enzyminduktion). Diese Erscheinung konnte auch bei den eingeschlossenen *C. simplex*, insbesondere bei den Poly(acrolein-co-NVP)-Immobilisaten gefunden werden. Zum Beispiel hatte ein durch Vernetzung mit 1,8-Di(oxyamino)-octan hergestellter Biokatalysator unmittelbar nach der Herstellung eine Aktivität von $8 \mu\text{Mol/h} \cdot g_{\text{Imm}}$. Bei wiederholten Umsetzungen steigerte sich die Aktivität stetig, um bei der fünften Umsetzung mit $35 \mu\text{Mol/h} \cdot g_{\text{Imm}}$ ein Maximum zu erreichen.

Wurden vergleichsweise freie *C. simplex* Zellen eingesetzt, so wurde bei der ersten Umsetzung eine Aktivität von $19 \mu\text{Mol/h} \cdot g_{\text{Zellen}}$ gefunden. Bei mehrfach wiederholten Umsetzungen fand unter den hier vorliegenden nicht sterilen Arbeitsbedingungen keine Aktivitätssteigerung statt, sondern es erfolgte innerhalb von fünf Umsetzungen eine vollständige Desaktivierung der Zellen.

Bei allen *B. sphaericus* Immobilisaten und bei den mit vernetzten PEI-Gelen eingeschlossenen *C. simplex* fand eine Enzyminduktion nur in geringem Maße statt.

Es wurde weiterhin die Möglichkeit untersucht, die Anzahl der in der polymeren Matrix fixierten aktiven Zellen durch eine Inkubation in einer Nährlösung zu erhöhen.

An einem *C. simplex* Immobilisat, hergestellt durch Vernetzung von Poly(acrolein-co-NVP) mit 1,8-Di(oxyamino)-octan wurde durch Gewichtsmessungen eine Vermehrung der eingeschlossenen Zellen von 190 mg auf 370 mg pro g_{Imm} festgestellt, wenn das Immobilisat in einer Lösung von 0,5 % Pepton und 0,5 mMol/l Hydrocortison inkubiert wurde. Gleichzeitig war damit eine Aktivitätssteigerung des Biokatalysators verbunden.

Eine Erhöhung der Aktivität durch Behandeln mit Nährlösung konnte bei sämtlichen Immobilisaten beobachtet werden. Dadurch ergab sich auch die Möglichkeit, während mehrfacher Umsetzungen verbrauchte Biokatalysatoren zu reaktivieren.

Die auf diese Weise erreichbaren maximalen Aktivitäten waren abhängig von der Art des einschließenden Gels und von der

Struktur des Vernetzers.

PEI-Immobilisate zeigten die niedrigsten Aktivitäten. Maximale Werte lagen hier bei $15 \mu\text{Mol/h} \cdot \text{g}_{\text{Imm.}}$ und $20 \mu\text{Mol/h} \cdot \text{g}_{\text{Imm.}}$, je nachdem, ob Glutaraldehyd oder Poly(acrolein) als Vernetzer verwendet wurde. Hier scheint die Tatsache eine Rolle zu spielen, daß eine Enzyminduktion erschwert ist.

Bei C. simplex Immobilisaten auf der Basis von Poly(acrolein-co-NVP) variierten die maximal erreichbaren Aktivitäten je nach Art des Vernetzers. Bei den aus Oxyethylen-Einheiten aufgebauten Vernetzern wurden fast einheitliche Aktivitäten der Immobilisate von 60 bis $70 \mu\text{Mol/h} \cdot \text{g}_{\text{Imm.}}$ gefunden (Abbildung 24), während bei den Di(oxyamino)-alkanen eine starke Abhängigkeit der Aktivität der Biokatalysatoren von den Kettenlängen beobachtet werden konnte. Bei Variation der Werte für n von 2 bis 8 ergaben sich Aktivitäten von 12 bis $60 \mu\text{Mol/h} \cdot \text{g}_{\text{Imm.}}$ (Abbildung 22).

Es wurde gefunden, daß die Unterschiede in der Aktivität unter anderem durch eine unterschiedliche Verteilung des Hydrocortison zwischen der wässrigen- und der Gel-Phase hervorgerufen wurden.

Gerade für die langkettigen Alkylendioxydiamine konnten besonders hohe Verteilungskoeffizienten für Hydrocortison festgestellt werden (Tabelle Seite 78). Wahrscheinlich liegt in dem verbesserten Stofftransport die hohe Aktivität dieser Immobilisate begründet.

Die Steroid-Umwandlung mit immobilisierten C. simplex Zellen konnte besonders effektiv gestaltet werden, indem Hydrocortison in fester Form als mikronisiertes Pulver in das Reaktionsgefäß eingebracht wurde. Bei diesem, im angelsächsischen Sprachraum als "Pseudocristallinofermentation" bezeichneten Verfahren, wurde weit mehr Substrat verwendet, als in der Fermentationsbrühe gelöst werden konnte. Es fand jedoch trotzdem eine rasche Steroid-Umwandlung statt, wobei innerhalb von 24 Stunden Prednisolon in mikrokristalliner Form gebildet wurde. Das Produkt konnte durch ein Sieb von dem Biokatalysator getrennt werden. Die maximale Ausbeute an reinem isolierten Prednisolon betrug bei diesem Verfahren 78 % der theoretischen Ausbeute. Dabei war 1 g Immobilisat in der Lage, innerhalb von 24 Stunden 572 mg Prednisolon zu produzieren.

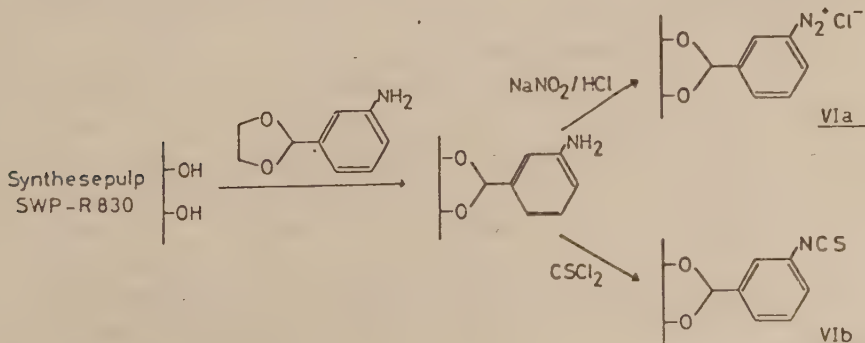
Mit demselben Immobilisat wurden mehrere aufeinander folgende Batch-Prozesse durchgeführt, wobei die Halbwertszeit der Aktivität im günstigsten Fall (Acrolein-NVP-Immobilisate, Vernetzer: 1,11-Di(oxyamino)-3,6,9-trioxa-undecan) 40 Tage betrug.

Als letzte Punkte bei der Beschreibung der durch Einschließung gebildeten Biokatalysatoren wurden die Stabilitäten unter Betriebsbedingungen und die Lagerstabilitäten untersucht.

Die Stabilität unter Betriebsbedingungen wird im wesentlichen durch die Halbwertszeiten der Aktivität bei mehrfach wiederholten Batch-Prozessen bestimmt. Bei den immobilisierten *B. sphaericus* wurden bis zu vierfach, bei den immobilisierten *C. simplex* bis zu 20fach längere Halbwertszeiten gefunden als bei den freien Zellen (Tabelle 5).

Die Untersuchung der Lagerstabilität ergab, daß bei 30° C über sechs Monate kein Aktivitätsverlust zu beobachten war. Bei + 5° C unter Phosphat-Puffer wurden nach zwei Monaten 75 % bis 90 % der ursprünglichen Aktivität wiedergefunden.

Der letzte Abschnitt der vorliegenden Arbeit befaßt sich mit der covalenten Bindung von *C. simplex* Bakterien an Synthesepulp (Hostapulp®). Hierbei handelt es sich um Polyethylen-Fibrade, die von Polyvinylalkohol bedeckt sind. Letzterer läßt sich durch Derivatisierung mit 2-(3-Aminophenyl)1,3-dioxolan umsetzen. Die dabei eingefügten Aminogruppen wurden entweder diazotiert oder mit Thiophosgen behandelt, um auf diese Weise zu reaktiven Diazoniumgruppen (VI a) oder Isothiocyanatogruppen (VI b) enthaltenden Trägern zu gelangen.



Die Träger wurden mit *C. simplex* Zellen in Kontakt gebracht, wobei eine covalente Bindung mit den Proteinen der Zellwand erwartet wurde. In der Tat wurden Immobilisate erhalten, die einen Zellgehalt von 80 mg (VI a) bzw. 160 mg (VI b) Zellen pro g_{Imm} aufwiesen.

Die Aktivitätsausbeuten betrugen 50 % (VI a) bzw. 33 % (VI b), und es konnten mehrfach wiederholte Steroid-Umwandlungen mit demselben Immobilisat durchgeführt werden. Im Falle NCS-Gruppen enthaltender Träger konnte die Aktivität einige Male durch eine Behandlung mit Nährlösung gesteigert werden.

Die Arbeit schließt mit Aufnahmen mikroskopischer Bilder der Immobilisate ab, die an einigen Beispielen die Anwesenheit immobilisierter Zellen erkennen lassen.

Es ist in der vorliegenden Arbeit gelungen, Mikroorganismen in synthetische Gele einzuschließen und auf diese Weise für die Steroid-Umwandlung von Hydrocortison zu Prednisolon geeignete Biokatalysatoren herzustellen. Gegenüber herkömmlichen Fermentationsverfahren mit frei suspendierten Zellen konnten hier die Vorteile der trägerfixierten Zellen wie Stabilität und Wiederverwendbarkeit besonders herausgestellt werden.

Durch geeignete Verfahren wie Enzyminduktion und Aktivierung mit Nährlösung konnte die Aktivität der Immobilisate auf ein vielfaches der Aktivität freier Zellen gesteigert werden.

Auch gelang es, durch Umsetzungen an festem Substrat eine besonders effektive Variante der Steroid-Umwandlung zu realisieren. Schließlich wurde noch die Möglichkeit gezeigt, ähnlich wie bei den immobilisierten Enzymen, auch eine covalente Bindung von ganzen Zellen an eine aktivierte polymere Matrix zu ermöglichen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 K. Kieslich; *Synthesis* 4, (1969) 120 u. 147
- 2 O. Zaborsky; *Immobilized Enzymes*, CRC Press, Cleveland (1973)
- 3 L. Goldstein, G. Manecke; *The Chemistry of Enzyme Immobilization in Appl. Biochem. Bioeng.* Vol. 1 (Hrsg. L. B. Wingard Jr., E. Katchalski-Katzir, L. Goldstein) Acad. Press N. Y. (1976) S. 29
- 4 H. H. Weetall; *Food Prod. Develop.* 1 (1973) 46
- 5 M. Nelboek, D. Jaworek; *Chimia* 29 (1975) 109
- 6 R. A. Messing, A. M. Filbert; *J. Agric. Food Chem.* 23 (1975) 920
- 7 C. Bucke in A. Wiseman; *Topics in Enzyme and Fermentation Technology* Kap. 7, Ellis Horwood, Chichester (1977)
- 8 H. C. Barfoed; *Enzyme Microbiol. Technol.* 1 (1979) 66
- 9 W. R. Vieth, K. Venkatasubramanian; *Methods Enzymol.* 44 (1976) 768
- 10 J. Konecny; *Chimia* 29 (1975) 95
- 11 I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, T. Mori; *Methods Enzymol.* 44 (1976) 746
- 12 W. Marconi; *Industrial Aspect of Biochemistry*, (Hrsg. B. Spencer) (1974) S. 139
- 13 E. Lagerlof, L. Nathorst-Westfelt, B. Ekstrom, B. Sjoberg; *Methods Enzymol.* 44 (1976) 759
- 14 R. Jerussi, H. J. Ringold; *Biochemistry* 4 (1965) 2113
- 15 S. Shimizu, H. Morioka, Y. Tani, K. Ogata; *J. Ferment. Technol.* 53 (1975) 77
- 16 W. Slowinski, S. E. Charm; *Biotechnol. Bioeng.* 15 (1973) 973
- 17 K. Mosbach, P. O. Larsson; *Biotechnol. Bioeng.* 12 (1970) 19
- 18 T. Sato, T. Tosa, I. Chibata; *Eur. J. Appl. Microbiol.* 2 (1976) 153
- 19 K. Yamamoto, T. Sato, T. Tosa, I. Chibata; *Biotechnol. Bioeng.* 16 (1974) 1601
- 20 B. Sharma, L. Bailey, R. A. Messing; *Angew. Chem.* 94 (1982) 836
- 21 A. M. Klivanov, G. P. Samokhin, K. Martinek, I. V. Berezin; *Biotechnol. Bioeng.* 19 (1977) 1351

- 22 T. Yamané, H. Nakatani, E. Sada, T. Omata, A. Tanaka, S. Fukui; *Biotechnol. Bioeng.* 21 (1979) 2133
- 23 B. J. Abbot; *Annual Report on Ferment. Proc.* Vol. 1 (Hrsg. D. Perlman), Acad. Press (1977) 205
- 24 E. N. Udvardy; *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 21 (1974) 237
- 25 H. G. Schlegel; *Allgemeine Mikrobiologie* 4. Aufl. G. Thieme Verlag Stuttgart (1976)
- 26 J. Abbot; *Adv. Appl. Microbiol.* 20 (1976) 203
- 27 T. R. Jack, J. E. Zajic; *Adv. Biochem. Eng.* 5 (1977) 125
- 28 J. Klein, F. Wagner in *Dechema Monograph.* 82 (1978) 142
- 29 I. Chibata, T. Tosa; *Adv. Appl. Microbiol.* 22 (1977) 1
- 30 U. Hackel, J. Klein, R. Megnet, F. Wagner; *Eur. J. Appl. Microbiol.* 1 (1975) 291
- 31 J. Klein, F. Wagner, P. Washausen, H. Eng, C. K. A. Martin; *Proc. 1st Eur. Cong. Biotechnol. Part 1,2* (1978) 190
- 32 K. Toda, M. Shoda; *Biotechnol. Bioeng.* 17 (1975) 481
- 33 K. Vekatasubramanian, R. Saini, W. R. Vieth; *J. Ferment. Technol.* 52 (1974) 268
- 34 W. R. Vieth, S. S. Wang, R. Saini; *Biotechnol. Bioeng.* 15 (1973) 565
- 35 T. M. S. Chang; *Nature* 229 (1971) 117
- 36 J. F. Kennedy, S. A. Barker, J. D. Humphries; *Nature* 261 (1976) 242
- 37 T. R. Jack, J. E. Zajic; *Biotechnol. Bioeng.* 19 (1977) 631
- 38 J. M. Navarro, G. Durand; *Eur. J. Appl. Microbiol.* 6 (1977) 23
- 39 D. E. Johnson, A. Ciegler; *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 130 (1969) 384
- 40 A. Nobile, W. Charney, D. L. Perlman, H. L. Herzog, C. C. Payne, M. E. Tully, M. A. Jevnik, F. B. Hershberg; *J. Am. Chem. Soc.* 77 (1955) 4184
- 41 H. J. Ringold, M. Hayano, V. Stefanovic; *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 1960
- 42 K. A. Koshcheenko, E. A. Borman, N. I. Ivannikova, P. M. Ashirov, G. K. Skryabin; *Appl. Biochem. Mikrobiol.* 12 (1976) 164

- 43 A. Tanaka; Eur. J. Appl. Mikrobiol. 7 (1979) 351
- 44 P. O. Larsson, S. Ohlson, K. Mosbach; Nature 263 (1976) 796
- 45 P. O. Larsson, K. Mosbach; Methods Enzymol. 44 (1976) 183
- 46 P. O. Larsson, S. Ohlson, K. Mosbach; Enzyme Eng. Vol. 4 (Hrsg. G. B. Broun, G. Manecke, L. B. Wingard) Plenum Press N. Y., London (1978) S. 317
- 47 S. Ohlson, P. O. Larsson, K. Mosbach; Biotechnol. Bioeng. 20 (1978) 1267
- 48 P. O. Larsson, S. Ohlson, K. Mosbach; Appl. Biochem. Bioeng. 2 (1979) 291
- 49 S. Ohlson, P. O. Larsson, K. Mosbach; Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 7 (1979) 103
- 50 A. Tanaka, I. N. Jin, S. Kawamoto, S. Fukui; Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 7 (1979) 351
- 51 T. Omata, A. Tanaka, T. Yamane, S. Fukui; Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 6 (1979) 207
- 52 K. Sonomoto, A. Tanaka, T. Omata, T. Yamane, S. Fukui; Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 6 (1979) 325
- 53 K. Venkatasubramanian, A. Constantinides, W. R. Vieth; Enzyme Eng. Vol. 3 (Hrsg. E. K. Pye, H. H. Weetall) Plenum Press N. Y. (1978) S. 29
- 54 A. Constantinides; Biotechnol. Bioeng. 22 (1980) 119
- 55 K. A. Koshcheenko, G. V. Sukhodol'skaya, V. S. Tyurin, G. K. Skryabin; Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12 (1981) 161
- 56 G. Manecke, W. Beier; Angew. Makromol. Chem. 104 (1982) 39
- 57 G. Manecke, W. Beier; Angew. Makromol. Chem. 113 (1983) 179
- 58 F. A. Quiocho, F. M. Richards; Biochemistry 5 (1966) 4062
- 59 C. G. Glasmeyer, J. D. Ogle; Biochemistry 10 (1971) 786
- 60 F. A. Quiocho; Methods Enzymol. 44 (1976) 551
- 61 F. M. Richards, J. R. Knowles; J. Mol. Biol. 37 (1968) 231
- 62 P. Monsan, G. Puzo, H. Mazarguil; Biochimi 57 (1975) 1281
- 63 Organikum 9. Aufl. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin (1970) S. 557
- 64 H. Thiele, K. H. Gronau; Makromol. Chem. 59 (1963) 207
- 65 R. C. Schulz, H. Cherdron, W. Kern; Makromol. Chem. 24 (1957) 141

- 66 R. C. Schulz; *Kunststoffe* 47 (1957) 303
- 67 R. C. Schulz, I. Löflund; *Angew. Chem.* 72 (1960) 771
- 68 R. C. Schulz; *Angew. Chem.* 76 (1964) 357
- 69 *Organikum* 9. Aufl. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin 1970 S. 428
- 70 R. C. Schulz, H. Cherdron, W. Kern; *Makromol. Chem.* 28 (1958) 197
- 71 R. C. Schulz, H. Cherdron, W. Kern; *Makromol. Chem.* 29 (1959) 190
- 72 R. C. Schulz, E. Kaiser, W. Kern; *Makromol. Chem.* 58 (1962) 160
- 73 G. T. Kekish (Nalco Chemical Co) U. S. 3,410,828 (1968) C. A. 70: 39060 q (1969)
- 74 T. B. Anikina et al. U. S. S. R. 522,198 (1976) C. A. 85: 144336 s (1976)
- 75 E. F. Panarin, V. K. Vasil'ev; *Khim. Farm. Zh.* 10 (1976) 64
- 76 E. Brown, A. Racois; *Makromol. Chem.* 179 (1978) 2887
- 77 D. H. Williams, I. Fleming; *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie* 2. Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1971)
- 78 T. Alfrey jr., C. C. Price; *J. Pol. Sci.* 2 (1947) 101
- 79 J. Brandrup, E. H. Immergut; *Polymer Handbook*, J. Wiley & Sons, N. Y. (1975) S. II 388 und II 394
- 80 H. G. Elias; *Makromoleküle*, Hüthig & Wepf Verlag Basel, Heidelberg, New York (1981) 4. Aufl. S. 630
- 81 B. Zeeh, H. Metzger; in *Houben-Weyl Methoden der org. Chemie*, Hrsg. E. Müller Bd 10/1 Georg Thieme Verlag Stuttgart (1965) S. 1097
- 82 A. T. Fuller, H. King; *J. Chem. Soc.* (1947) 963
- 83 L. Bauer, K. S. Suresh; *J. Org. Chem.* 28 (1963) 1604
- 84 J. Dale, P. O. Kristiansen; *Acta Chem. Scand.* 26 (1972) 1481
- 85 W. Theilacker, K. Ebke; *Angew. Chem.* 68 (1956) 303
- 86 W. Marckwald, M. Wille; *Ber.* 56 (1923) 1319
- 87 P. Karlson; *Kurzes Lehrbuch der Biochemie* 10. Aufl. Thieme Verlag Stuttgart (1977)
- 88 J. Klein, F. Wagner; *Dechema-Monograph.* 84 (1979) 265

- 89 P. Kabasakalian, J. McGlotten; J. Am. Chem. Soc. 78
(1956) 5032
- 90 Metrohm AG "Die Untersuchungs- und Meßmethoden des
Polarecord E 506" (Firmenschrift)
- 91 A. M. Bond, R. O'Halloran; J. Eletroanal. Chem. 68
(1976) 257
- 92 A. M. Klibanov; Anal. Biochem. 93 (1979) 1
- 93 B. K. Lee, W. E. Brown, D. Y. Rye, R. W. Thoma;
Biotechnol. Bioeng. 13 (1971) 503
- 94 F. Lavelle, A. M. Michelson, L. Dimitrijevic;
Biochem. Biophys. Res. Commun. 55 (1973) 350
- 95 M. Rippe; 3. Symp. Techn. Mikrobiol. Berlin (1973) 123
- 96 L. Penasse, M. Peyre; Steroids 12 (1968) 525
- 97 D. P. Bhasin, C. C. Gryte, J. F. Studebaker; Biotechnol.
Bioeng. 18 (1976) 77
- 98 F. Kondo, E. Masuo; J. Gen. Appl. Microbiol. 7 (1961) 113
- 99 G. Manecke, W. Beier; Veröff. in Vorbereitung
- 100 Ger. Offen. 2,249,604 (1973), Crown Zellerbach Internatio-
nal, C. A. 79: 7064p (1973)
- 101 W. Gordon, H. J. Leugering, H. Cherdron; Angew. Chem. 90
(1978) 833
- 102 G. Manecke, H. G. Vogt; Angew. Makromol. Chem. 85 (1980)
41
- 103 G. Manecke, H. G. Vogt; Angew. Makromol. Chem. 88 (1980)
37 - 59
- 104 R. Pohl; Dissertation, Freie Universität Berlin (1978)
- 105 W. Theilacker, E. Wegner; Angew. Chem. 72 (1960) 127
- 106 P. Kabasakalian, S. De Lorenzo, J. Mc Glotten;
Anal. Chem. 28 (1956) 1669

LEBENS LAUF

Am 3.10. 1943 wurde ich in Tittingdorf, Landkreis Melle (Niedersachsen), als Sohn des kaufmännischen Angestellten Artur Klussmann und der Hausfrau Luise Strohscher, verw. Klussmann, geboren.

Ich besuchte von 1950 bis 1954 die Grundschule und danach das Städtische Gymnasium in Melle. 1960 wechselte ich an das Ratsgymnasium nach Osnabrück, wo ich den naturwissenschaftlichen Zweig besuchte und 1963 mein Abitur ablegte. Im gleichen Jahr begann ich das Studium der Chemie an der Freien Universität Berlin. Von 1966 bis 1970 mußte ich mein Studium aus persönlichen Gründen unterbrechen.

1972 bestand ich die Diplomvorprüfung im Fach Chemie.

Den mündlichen Teil der Diplomhauptprüfung legte ich im Sommersemester 1977 ab. Anschließend fertigte ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Manecke die Diplomarbeit mit dem Thema "Herstellung und Untersuchung wasserlöslicher Polyäthylenimin-Derivate als Träger zur covalenten Bindung von Trypsin" an und beendete sie im Wintersemester 1978/79. Im März 1979 begann ich mit der Arbeit an der vorliegenden Dissertation.

Von 1970 bis 1973 war ich als studentischer Tutor im Praktikum Chemie für Mediziner beschäftigt. Seit dem 1. Mai 1979 bin ich wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin mit Einsatz im organisch-chemischen Grundpraktikum für Lehramtskandidaten und im organisch-chemischen Praktikum für Biologen sowie seit Mai 1980 Privatassistent bei Prof. Dr. G. Manecke.

In erster Ehe war ich von 1970 bis 1974 verheiratet. Ich habe aus dieser Ehe zwei Kinder: Lydia Klussmann, geb. 23.8.67 und Martin Klussmann, geb. 11.10.69.

Seit Oktober 1980 bin ich mit der Germanistikstudentin Christiane Petzold-Klussmann verheiratet, deren Tochter Mirjam Petzold, geb. 3.10.70, mit in unserem Haushalt lebt.

